

GISELE CARVALHO MENDES

**INFLUÊNCIA DOS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DE CRESCIMENTO E
SAZONALIDADE NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Piptadenia gonoacantha***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Camilo Amaro de Carvalho

Coorientadoras: Silvia Almeida Cardoso
Catarina Maria N. de Oliveira Sedyama

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2023**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus

T

538i
2022

Mendes, Gisele Carvalho Mendes, 1986-
Influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade na atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha* / Gisele Carvalho Mendes Mendes. - Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (66 f.): il.
Inclui anexo.
Inclui apêndice.
Orientador: Camilo Amaro de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Medicina e Enfermagem, 2022.
Inclui bibliografia.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.099>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Piptadenia gonoacantha*; 2. Agentes antiinfeciosos; 3. Plantas medicinais; 4. Estações do ano; 5. Testes de toxicidade; 6. Testes de sensibilidade bacteriana; I. Carvalho, Camilo Amaro de II. Universidade Federal de Viçosa.. Departamento de Medicina e Enfermagem. Programa de Pós-Graduação Ciências da Saúde III.
Título

CDD 22. ed. 615.321

Bibliotecário(a) responsável: ALICE REGINA PINTO PIRES CRB-6/2523

GISELE CARVALHO MENDES

**INFLUÊNCIA DOS ESTÁDIOS FENOLÓGICOS DE CRESCIMENTO E
SAZONALIDADE NA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE *Piptadenia gonoacantha***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 15 de dezembro de 2022.

Assentimento:

Gisele Carvalho Mendes
Gisele Carvalho Mendes
Autora

Documento assinado digitalmente
gov.br CAMILO AMARO DE CARVALHO
Data: 15/03/2023 10:04:51-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Camilo Amaro de Carvalho
Orientador

Dedico este trabalho aos meus filhos, João Neto e Benício, que mesmo tão pequenos iluminam meu caminho e trazem felicidade para minha vida.

AGRADECIMENTOS

É com grande emoção que escrevo estas palavras de agradecimentos! Foram tantas pessoas que fizeram parte desta trajetória e me sinto abençoada por tê-las comigo.

Deus, sabiamente, me deu força e coragem. Graças a Ele pude enfrentar meus medos e angústias.

Ao meu esposo, João Júnior, por todo amor e dedicação diária a mim e a nossa família. Meus filhos, João Neto e Benício, são minhas riquezas e alegria. Minha família é o meu alicerce, amo vocês! Obrigada por tudo!

Aos meus pais pelo apoio e amor que me fortalecem todos os dias!

Aos meus irmãos, Luisa e André, pelas palavras de incentivo, carinho e ouvintes em momentos de desabafos. São os melhores!

Agraço aos meus colegas do LAC DSA, pelo apoio e conselhos. Tenho sorte de trabalhar com grandes profissionais.

Aos meus colegas da Divisão de Saúde e do mestrado, pela torcida e incentivo.

Ao Departamento de Medicina Enfermagem pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos profissionais. Em especial, aos técnicos do Laboratório de Bioquímica que me auxiliaram no projeto.

Ao meu orientador Professor Camilo, sem sua colaboração e empenho eu não teria concluído este trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e a Divisão de saúde, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

Grata por todos os momentos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

MENDES, Gisele Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade na atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha***. Orientador: Camilo Amaro de Carvalho. Coorientadoras: Silvia Almeida Cardoso e Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sedyama.

As plantas medicinais, que tem seu potencial terapêutico pouco explorados, são alternativas para desacelerar a resistência bacteriana. Pesquisas mais complexas são necessárias para melhor utilização do material vegetal em novas formulações medicamentosas. Este trabalho é um estudo experimental *in vitro* realizado pelo método de difusão em meio sólido com perfuração em ágar que determinou a preparação do material vegetal, a atividade antibacteriana, a concentração inibitória mínima (CIM) e teste de toxicidade. Todas as análises citadas foram realizadas usando o extrato hidroalcoólico da folha de *Piptadenia gonoacantha*, uma espécie arbórea amplamente distribuída por todo o Brasil que possui composição química promissora para fins terapêuticos. O objetivo foi avaliar se a estação do ano e os estádios fenológicos influenciam na ação antibacteriana do extrato de *P. gonoacantha*. O extrato (500 mg/mL) apresentou atividade antibacteriana para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e *Pseudomonas putida*. O extrato das folhas colhidas no inverno e em árvores com diâmetro de tronco entre 5 e 10 cm apresentaram os melhores resultados, com halos de inibição $\geq 8,0$ mm em maior quantidade se comparado as demais. A CIM foi de 62,5 mg/mL para *S. aureus*, 15,6 mg/mL para *S. pyogenes* e 31,2 mg/mL para *P. putida*. O extrato foi considerado atóxico através do teste com *Artemia salina*. A partir dos resultados deste estudo, pode-se concluir que a padronização da colheita das folhas de *P. gonoacantha* quanto a estação do ano e classe diamétrica é muito relevante, uma vez que, influencia na ação terapêutica. Sugere-se a continuidade dos estudos da *P.gonoacantha* por apresentar resultados promissores para inovações na área de medicamentos.

Descritores: Antimicrobianos. Plantas Medicinais. Estações Climáticas. Testes de Sensibilidade Microbiana. Testes de toxicidade.

ABSTRACT

MENDES, Gisele Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Influence of growth and seasonality phenological stages on the antibacterial activity of *Piptadenia gonoacantha***. Adviser: Camilo Amaro de Carvalho. Co-advisers: Silvia Almeida Cardoso and Catarina Maria Nogueira de Oliveira Sedyama.

Medicinal plants, whose therapeutic potential is largely unexplored, are alternatives to slow down bacterial resistance. More complex research is needed for a better use of plant material in new drug formulations. This work was an experimental in vitro study, conducted by the diffusion method in solid medium with agar perforation, which determined the preparation of plant material, antibacterial activity, minimum inhibition concentration (MIC), and toxicity test. All the analyses mentioned were performed using the leaf extract of *Piptadenia gonoacantha*, a tree species widely distributed throughout Brazil, that has a promising chemical composition for therapeutic purposes. The objective was to evaluate whether the season and phenological stages influence the antibacterial action of *P. gonoacantha* extract. The toxicity test was a complement to advances in the stages of development of a possible drug. The extract showed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Pseudomonas putida*. The extract was considered nontoxic through the *Artemia* saline test. From the results of this study, it can be concluded that the standardization of the harvest of *P. gonoacantha* leaves is very relevant, as it influences the therapeutic action. It is suggested that studies on *P. gonoacantha* be continued, as it shows promising results for innovations in the field of medicine.

Descriptors: Antimicrobials. Medicinal Plants. Climate Seasons. Microbial Sensitivity Tests. Toxicity Tests.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Piptadenia gonoacantha</i>	14
Figura 2 – Coleta e preparo das amostras. A: Classificação diamétrica das árvores; B: Identificação dos extratos de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	22
Figura 3 – Halos de inibição da atividade antibacteriana do extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i> por difusão em ágar frente à bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> na estação de outono. Circulos vermelhos demonstrando os halos de inibição bacteriana.....	24
Figura 4 – Avaliação da toxicidade do extrato de <i>P. gonoacantha</i> frente a <i>Artemia salina</i> . (A) Eclosão dos ovos de <i>Artemia salina</i> ; (B) Ensaio de toxicidade das amostras em diferentes concentrações.....	25

Artigo 1:

Figura 1 – Tamanho dos halos de inibição bacteriana observados em cinco estádios fenológicos de crescimento (<i>dap</i>) de <i>P. gonoacantha</i> nas quatro estações. Os vetores-linha indicam os valores mínimo, médio e máximo de tamanho de halos.....	34
Figura 2 – Tamanho dos halos de inibição bacteriana observados em cinco classes estádios fenológicos de crescimento de <i>P. gonoacantha</i> nas quatro estações. As classes de <i>dap</i> 1 a 5, correspondem, respectivamente, a 5 a 10 cm de <i>dap</i> , 10 a 15 cm, 15 a 20 cm, 20 a 25 cm e <i>dap</i> > 25 cm. Médias com mesma letra não diferem pelo teste t para amostras independentes ($p > 0,05$).....	35
Figura 3 – Estatística do teste Z para cada combinação atividade antibacteriana frente a <i>P. putida</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. pyogenes</i> e a influência da estação do ano.....	38

LISTA DE TABELAS

Artigo 1:

Tabela 1 – *p*-valores para o teste *t* para amostras independentes aplicado para avaliar o efeito estádio de crescimento (1 a 5) da *P. gonoacantha* no tamanho do halo inibição bacteriana de *P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes* nas quatro estações do ano.....36

Tabela 2 – Proporção de casos com halo > 8 mm (p) e de casos com halo ≤ 8 mm (q), para as bactérias *P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes* nas quatro estações do ano.37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CENTEV	Centro Tecnológico de Viçosa – MG
CIM	Concentração Inibitória Mínima
<i>Dap</i>	Diâmetro à Altura do Peito
EPG	Extrato de <i>Piptadenia gonoachanta</i>
MCA	Medicina Complementar e Alternativa
MS	Ministério da Saúde
MT	Medicina Tradicional
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Plantas medicinais	13
2.2. Características da <i>Piptadenia gonoacantha</i> (Pau Jacaré).....	14
2.3. Resistência bacteriana.....	15
2.4. Desenvolvimento de novos fármacos	16
2.5. Sazonalidade	17
2.6. Fenologia	17
2.7. Toxicidade	19
3 OBJETIVOS	21
3.1. Objetivo Geral	21
3.2. Objetivos Específicos	21
4 MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Preparo das amostras	22
4.2. Preparo do meio de cultura e das bactérias.....	23
4.3. Atividade antibacteriana	23
4.4. Determinação da concentração inibitória mínima	24
4.5. Avaliação da toxicidade do extrato de <i>Piptadenia gonoacantha</i>	25
4.6. Metodologia estatística	25
5 RESULTADOS	27
5.1. Artigo 1	27
5.2. Produto técnico	46
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.....	64
APÊNDICE A – Resumo gráfico das etapas realizadas no teste de atividade antibacteriana..	66

1 INTRODUÇÃO

O desafio na descoberta de uma nova classe de antibióticos já dura mais de 30 anos, e continua sem muitas perspectivas. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021), descobrir um novo antibiótico depende de grande apoio financeiro e investimento em pesquisas por um longo período, o que reforça a urgência em novas tecnologias.

Atualmente, umas das alternativas para produção de fármacos é a produção de estruturas moleculares totalmente sintetizadas em laboratório. Mas os diversos procedimentos e a taxa de insucesso são um dos fatores que elevam o orçamento da fabricação e comercialização. Isso salienta o crescimento de técnicas, como as aplicadas na área de biotecnologia, na produção de medicamentos à base de plantas, que possuem complexidade metabólica e ampla diversidade de compostos, instigando ainda mais as pesquisas na área (CHAVES; SILVA; CORTEZ, 2021).

A biotecnologia é o conjunto de técnicas que permite implantar processos na indústria farmacêutica, no cultivo de mudas, no preparo de amostras, desenvolvimento de novos fármacos entre outras bioatividades (GUSMÃO; SILVA; MEDEIROS, 2017). Em paralelo com o desenvolvimento de inovações antibacterianas, medidas de políticas públicas, como o uso racional e a correta prescrição de antibióticos, prevenção de infecções e igualdade na distribuição dos medicamentos, se fazem necessárias para o combate à resistência bacteriana frente as inovações (WHO, 2017). Isso se torna particularmente importante ao considerar os impactos causados pela baixa eficiência dos medicamentos, tanto na parte econômica, devido ao prolongamento da assistência hospitalar e do tratamento, quanto na qualidade de vida dos pacientes e mortalidade (HALUCH et al., 2020).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2018) as plantas medicinais correspondem a espécies vegetais, cultivadas ou não, utilizadas com propósitos terapêuticos. O Ministério da Saúde (MS), por meio de políticas nacionais e internacionais, tem incentivado a medicina tradicional, a medicina complementar e alternativa (MT/MCA) e seus produtos, a fazerem uso de plantas medicinais e da fitoterapia na Atenção Básica. Com isso, o MS tem por objetivo ampliar a oferta e o acesso da população a produtos fitoterápicos que, de forma segura e uso racional, contribui para uma prática mais econômica, visando uma melhor atenção à saúde da população.

Diante do exposto, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), aprovada em 2006, corrobora com as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e propõe a implantação e adequação de ações e serviços, dentre eles a utilização de plantas medicinais e fitoterapia no SUS (BRASIL, 2012).

A ação terapêutica das plantas se deve aos metabólitos secundários produzidos, cujos teores e produção podem sofrer variações na quantidade ou mesmo na natureza dos constituintes ativos, a depender de características do ambiente, como a época do ano em que é coletada, o comprimento e tempo de vida da planta (CARDOSO et al., 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; MOORE et al., 2014). Um ponto importante no estudo de princípios ativos de uma planta são os estádios fenológicos da cultura (ANDALORO et al., 1983), o que facilita a transposição de informação sobre a cultura, tendo em vista que a duração do ciclo reprodutivo de cada vegetal é função também da interação com os componentes do ambiente como temperatura, e disponibilidade de água e luz, por exemplo.

A *Piptadenia gonoacantha*, objeto deste estudo, é uma espécie arbórea, da família Fabaceae, nativa da Mata Atlântica no sul e sudeste do Brasil, popularmente conhecida como “pau jacaré”, e comumente utilizada para o tratamento de distúrbios inflamatórios (CARVALHO et al., 2014). Estudos prévios com a *P. gonoacantha* demonstraram atividade anti-inflamatória, antinociceptiva (CARVALHO, 2012; FRANCO, 2018), antibacteriana, e cicatrizante (RIBEIRO, 2018), bem como atoxicidade (FAUSTO, 2017). Frente ao exposto, torna-se fundamental a sistematização de técnicas para uma melhor comprovação científica da real utilização dos fitoterápicos e validação dos processos tecnológicos de cultivo, produção, e sua utilização nas formulações medicamentosas. Para tanto, este trabalho tem por objetivo contribuir para um melhor conhecimento da espécie em estudo, visando avaliar a ação antibacteriana in vitro sobre algumas cepas usando o extrato das folhas da *P. gonoacantha* colhidas durante as quatro estações climáticas e classe diamétrica distintas.

A presente dissertação foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Federal de Viçosa – UFV. O corpo do trabalho compreende uma introdução, objetivos gerais e específicos, metodologia, um artigo científico, um produto técnico e uma conclusão. O artigo intitulado “Influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade na atividade antibacteriana de *Piptadenia gonoacantha*” foi formatado de acordo com as normas da revista Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, (Qualis B1 – Medicina I), para a qual o artigo foi submetido. Além do artigo, destaca-se o produto técnico em forma de uma cartilha informativa intitulada: Plantas medicinais na resistência bacteriana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas medicinais

Segundo a OMS, as plantas medicinais podem ser classificadas como silvestre ou cultivada, com utilizações direta ou como precursoras no tratamento da saúde, objetivando a prevenção de doenças, o alívio de sintomas, a mudança e até mesmo a cura de um determinado processo fisiológico patológico (ARIAS, 1999).

No Brasil, o uso dessas plantas tem sido estimulado pelo MS no contexto das práticas complementares de cuidados à saúde, de forma que foi implantado pelo Ministério, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), com o intuito de estimular o estudo sobre e o acesso às plantas medicinais no cuidado e promoção da saúde (BRASIL, 2015).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a OMS divulgou que 65- 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (AKERELE, 1993; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Mesmo com o surgimento dos medicamentos sintéticos, a fitoterapia continuou com sua importância, em virtude, principalmente, dos altos custos dos sintéticos e de seus variados efeitos colaterais (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Ainda, é necessário pensar que a presença de bactérias em feridas pode ser ainda mais agravada, causando infecções, de forma que seu tratamento pode gerar enormes custos e maiores complicações à saúde, aumento do tempo de hospitalização e do risco de morbimortalidade. Sendo assim, a busca por compostos que tenham elevado poder de cicatrização é fundamental e tem sido alvo de estudos relacionados à fitoterapia (TRINDADE *et al.*, 2010; PONNUSAMY *et al.*, 2015). (PONNUSAMY *et al.*, 2015)

Dentro desse contexto de estudo das plantas medicinais e da busca por produtos naturais que sejam eficazes e seguros, o interesse pelos óleos e extratos das plantas cresceu, sendo alvos de inúmeras pesquisas em todo o mundo (OLIVEIRA *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2012). A literatura já demonstra que os óleos essenciais e os extratos vegetais apresentam propriedades terapêuticas importantes: antimicrobiana, antisséptica, anti-inflamatória, antiviral, larvicida, analgésica, expectorante, antiespasmódica, vermífuga e cicatrizante (GONÇALVES *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2006).

O metabolismo secundário das plantas dá origem a importantes substâncias químicas

que podem ser extraídas e utilizadas para produzir extratos bioativos e óleos essenciais (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Os extratos vegetais são constituídos por partículas bioativas que variam seus teores segundo a polaridade do solvente extrator, já os óleos essenciais são constituídos de substâncias voláteis presente no vegetal, e que geralmente tem função de defesa contra microrganismos (SIQUI *et al.*, 2000).

No geral, as substâncias bioativas comuns aos óleos e aos extratos apresentam baixo peso molecular e uma estrutura bastante complexa que aumenta a absorção e metabolização, características importantes para um fármaco eficaz (FABRI *et al.*, 2011). Alguns exemplos dessas substâncias, são os terpenos e os fenilpropanóides (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003).

2.2. Características da *Piptadenia gonoacantha* (Pau Jacaré)

A *Piptadenia gonoacantha* é pertencente à família Fabaceae, uma espécie arbórea caducifólia nativa da Mata Atlântica, sendo conhecida como Pau Jacaré, encontrado comumente no sul e sudeste do Brasil (Figura 1). Sua aparência é de uma árvore com que apresenta no tronco e nos ramos cascas em formato de asas longitudinais preenchidas por espinhos lenhosos (CARVALHO *et al.*, 2010; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Figura 1 – *Piptadenia gonoacantha*



Fonte: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação-UFV.

Diversos compostos fitoquímicos são encontrados em sua composição, a saber: triterpenos como friedelina, lupenona, lupeol e cicloartenona; esteroides, como sitosterol,

campesterol e estigmasterol; saponina, como sitosterol-3-O- β -D- glucopiranosídeo; flavonoides, como apigenina, vitexina e isovitexina; aperfenamato; e galato de metila (CARVALHO *et al.*, 2010).

Essa espécie é muito utilizada na medicina popular para tratar doenças inflamatórias e também é alvo de muitos estudos em virtude das reconhecidas propriedades de seu extrato, quais sejam: ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antinociceptiva e antibacteriana. Seu extrato apresenta também compostos flavônicos que tem propriedades de cicatrização, vasodilatação, antioxidação, analgesia, anti- inflamação, as quais somadas as propriedades gerais do extrato, aumentam a qualidade medicinal dessa espécie (BASTOS *et al.*, 2009; CARVALHO, 2012)

Além disso, as folhas do Pau Jacaré apresentam compostos que são capazes de estimular o processo de cicatrização por aumentar a síntese de colágeno (CLARK, 2013; FRANCO, 2018). Segundo Carvalho *et al.* (2014) o extrato da *P. gonoacantha* com etanol apresentou importante atividade antimicrobiana frente a bactéria *Staphylococcus aureus*, de forma que seus compostos podem ser precursores de medicamentos para o combate de microrganismos resistentes, devendo, portanto, serem melhor investigados (CARVALHO *et al.*, 2014)

2.3. Resistência bacteriana

A busca por novos de fármacos, especialmente os naturais, tem se destacado no contexto atual em que a larga produção de novos antibióticos e o uso exacerbado dos mesmos têm aumentado de forma considerável a resistência dos microrganismos às drogas sintéticas. As bactérias, por exemplo, apresentam grande capacidade em adquirir resistência aos medicamentos sintéticos, e também de transmitir geneticamente essa resistência para sua prole (BROWNE *et al.*, 2020). Isso faz com que novos medicamentos, de origem natural, sejam considerados como opções terapêuticas importantes (BERTINI *et al.*, 2005).

A antibioticoterapia precoce e estendida são um dos fatores que corroboram com o aumento de cepas resistentes, principalmente em unidades específicas de patologias graves (ARANCIBIA, 2019; MARAN, 2020). A dispensação de antibióticos, em ambiente hospitalar ou não, cresceu durante a pandemia da COVID-19. Mesmo sendo uma pandemia viral (SARS-CoV-2), alguns sintomas são semelhantes as infecções caudas por bactérias, principalmente na parte pulmonar, levando a administração rápida e desnecessária de fármacos (SILVA; NOGUEIRA, 2021).

O crescimento acelerado da resistência, ameaça a efetividade de algumas alternativas para terapia convencional com antibióticos, como ocorre com a utilização de vacinas. Os

benefícios da vacinação dependem de um espectro amplo de pessoas imunizadas e, até que o seu potencial terapêutico e comercialização sejam atingidos, o patógeno alvo pode ter adquirido mecanismo de defesa contra ela e inviabilizar a sua utilização (CHEESMAN *et al.*, 2017). Porém, estudos já mostraram que vacinas conjugadas e até mesmo as vacinas virais são capazes de auxiliar na diminuição da resistência microbiana, uma vez que, as vacinas atuam na prevenção da instalação de um processo infeccioso ou na diminuição dos sintomas (JANSEN; ANDERSON, 2018).

Um estudo de revisão sistemática desenvolvido por Marmitt e colaboradores (2015) apresentou plantas medicinais com potencial antibacteriano que atuam sobre *Staphylococcus aureus*, sendo elas: Alho (*Allium sativum*), Carqueja (*Bacharis trimera*), Picão (*Bidens pilosa*), Cravo-de-defunto (*Tagetes minuta*), Camomila (*Matricaria chamomilla*), Funcho (*Foeniculum vulgare*), Eucalipto-comum (*Eucalyptus globulus*), Pitanga (*Eugenia uniflora*), Menta (*Mentha piperita*) e Gengibre (*Zingiber officinale*) (MARMITT *et al.*, 2015).

2.4. Desenvolvimento de novos fármacos

A descoberta de moléculas promissoras demanda investimento, conhecimento tecnológico e pode levar anos. A estrutura química dos metabólitos inovadores precisa ser aperfeiçoada para alcançar potência, seletividades, toxicidade e característica fisicoquímicas adequadas para uma maior chance de avançar no processo de desenvolvimento desse novo fármaco. A resistência bacteriana (mutação cromossômica) acontece em uma velocidade desproporcional ao processo total da criação do medicamento (LIU *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de novos fármacos começa com a concepção do projeto e abordagem de doença ou alvo molecular, e posteriormente com a identificação de compostos com atividade biológica para o objetivo proposto. Os metabólitos inovadores precisam ser aperfeiçoados para alcançar potência, seletividades, toxicidade e características fisicoquímicas adequadas para uma maior chance de avançar no processo de desenvolvimento desse novo fármaco (CHAVES; SILVA; CORTEZ, 2021; LIU *et al.*, 2021).

Uma opção que vem sendo estudada, é a utilização dos compostos bioativos naturais para inibir o mecanismo de resistência e possibilitar a ação mais eficaz do antibiótico existente. Como ocorre com as substâncias chamadas de inibidores da bomba de efluxo que atuam sobre o mecanismo de bomba de efluxo (depleção do fármaco no meio intracelular) utilizado pelas bactérias para garantir resistência aos medicamentos (SILVA, 2015). Alterações no sistema de transporte, inativação enzimática e alterações do sítio de ligação são outros métodos utilizados pelas bactérias para se proteger da ação dos antibacterianos.

Estudos para o desenvolvimento de antimicrobianos com o sítio de ação específico e descoberta de moléculas promissoras com capacidade de atuação conjunta para aumentar a efetividade antimicrobiana das drogas existentes, estão entre as estratégias criadas através da engenharia genética para combater as cepas multirresistentes (CHERNOV *et al.*, 2019).

2.5. Sazonalidade

A composição biologicamente ativa das plantas se dá através dos metabólitos secundários. As mudanças das características do vegetal nas estações do ano, tanto do ambiente quanto do funcionamento biológico das plantas, são um dos fatores que influenciam na produção desses metabólitos e podem interferir na sua ação farmacológica (COSTA, 2017).

Assim, a época em que é feita a coleta pode influenciar na quantidade e na natureza dos constituintes ativos, uma vez que não são constantes ao longo de todo o ano. Praticamente todas as classes de metabólitos secundário têm seu conteúdo afetado por variações sazonais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A sazonalidade climática é um dos principais fatores que regulam a floração e a frutificação da planta. A *Piptadenia gonoacantha* normalmente floresce no inverno e no início da estação úmida, contudo, pode também florescer nos meses mais quentes e de maior precipitação, mostrando a sincronização da floração com a estação, e a influência da sazonalidade no início e duração da floração dessa espécie. A frutificação também é influenciada pela sazonalidade, e o incremento da circunferência do tronco das árvores mostra uma estreita relação com a sazonalidade da precipitação pluviométrica (MARIA, 2002).

Além disso, há relato de que a composição de metabólitos secundários de uma planta pode variar de maneira considerável nos períodos de dia e noite, como por exemplo, apresentando variações circadianas nas concentrações de óleos essenciais. Ainda, pode haver confusão entre o que é causado por efeito da sazonalidade e o que é causado por alterações metabólicas internas da planta, o que precisa ser considerado separadamente. Outro ponto importante é que quanto mais jovem o tecido, maior será a taxa biossintética de metabólitos, o que é importante no estudo dos potenciais fitoterápicos das plantas e seus metabólitos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2.6. Fenologia

As condições que favorecem a distribuição de espécies e gêneros vegetais variam de acordo com a área geográfica, sendo que cada área favorece um tipo de vegetação, que podem ser descritos segundo a sua estrutura (fisionômica ou florística), ou ainda, segundo as características biofísicas do ambiente, classificadas de acordo com o solo ou tipo florestal.

Ainda, sabe-se que o clima também interfere de maneira importante na formação do solo e da vegetação (VERONA, 2002; WALTER, 1986).

Nesse contexto, a fenologia se estabelece como o estudo da ocorrência de eventos biológicos repetitivos, e das causas dessa ocorrência em relação às forças bióticas e abióticas, os quais, dentro do reino vegetal, consistem na floração e frutificação, que são os principais mecanismos de perpetuação de espécies e que são influenciados por fatores genéticos e/ou ambientais, como por exemplo, variações climáticas e tipo de solo. Os fatores bióticos (fisiologia controlada pela genética) específicos para cada espécie, associados ao clima e fotoperíodo, são ditos como causas desses eventos repetitivos (VERONA; SHIMABUKURO; SANTOS, 2005).

A classificação fenológica da vegetação é importante para melhor compreender a influência das mudanças climáticas e de outros elementos e fenômenos da natureza. Identificar a origem fenológica é importante, por exemplo, para distinguir a sazonalidade climática da deciduidade causada pela redução de chuvas em virtude de ações antrópicas (NELSON, 1994).

Em suma, compreender os estádios fenológicos, auxilia no entendimento de sua adaptação e dinâmica, e funciona como indicador das variações climáticas ambientais. As características fenológicas permitem avaliar as alterações nas atividades cambial, auxiliar os estudos de formação dos tecidos e das estratégias de crescimento das espécies (WALTER, 1986).

Os estudos voltados para a fenologia vegetal direcionam questões que envolvem modelagens globais e monitoramento das mudanças climáticas, e auxiliam em programas de manejo de recursos naturais. Assim, mapear o estágio fenológico e a presença ou ausência de concentrações de constituintes químicos específicos são importantes no contexto de aplicações fitoterápicas (ANDALORO *et al.*, 1983; VERONA; SHIMABUKURO; SANTOS, 2005).

Segundo Ferreira (2002),

As variações da temperatura, precipitação, radiação solar e de outros fatores climáticos em áreas tropicais são, frequentemente, consideradas de menor significação ecológica em comparação com os climas temperados, quando é discutido o ritmo do crescimento das árvores. Contudo, os estudos dos eventos fenológicos de espécies arbóreas tropicais têm demonstrado uma nítida periodicidade desses eventos, na produção e queda de folhas, frutificação, floração, etc., induzidos por fatores climáticos, refletindo na atividade cambial e na formação de anéis de crescimento (p. 5).

Nesse sentido, com relação as características da espécie analisada neste estudo, tem-se que o processo reprodutivo do pau-jacaré se inicia nos plantios com solos de elevada fertilidade

química, a partir de três anos de idade (CARVALHO, 2004). Algumas características importantes de se conhecer são com relação a fenologia dessa espécie.

A floração do pau-jacaré varia de acordo com o tempo e o lugar. No Distrito Federal, se dá de agosto a janeiro, no Rio Grande do Sul de agosto a fevereiro, no Paraná de setembro a janeiro, no Estado de São Paulo de outubro a janeiro, em Minas Gerais de novembro a janeiro, e no Estado do Rio de Janeiro de dezembro a março (CARVALHO, 2004).

Por sua vez, a frutificação também varia segundo época do ano e local, sendo que os frutos amadurecem de maio a setembro no Paraná, de maio a outubro em Minas Gerais, de junho a novembro no Estado do Rio de Janeiro, de junho a dezembro no Estado de São Paulo e de julho a agosto no Distrito Federal. Com relação a dispersão de frutos e sementes, é autocórica, sendo barocórica por gravidade e anemocórica pelo vento (CARVALHO, 2004).

Compreender a fenologia dessa espécie é bastante útil para os estudos direcionados a sua capacidade fitoterápica.

2.7. Toxicidade

As plantas medicinais podem ser utilizadas de forma indiscriminada por, muitas vezes, serem consideradas livres de substâncias que são prejudiciais para a saúde e interpretado como saudáveis, simplesmente por se tratar de um produto natural (PESSOA, 2013). Entretanto, essa visão é extremamente equivocada, já que muitas plantas possuem um potencial de toxicidade para organismos vivos (MENGUE; MENTZ; SCHENKEI, 2001).

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou quase nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e até muitas vezes empregadas para fins medicinais. Comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, a toxicidade de plantas medicinais pode parecer trivial (MARTINS; GARLET, 2016). Entretanto, a toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. De acordo Junior *et al.*, (2005) “os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a ação sinérgica (interação com outras drogas) ocorrem comumente”.

A toxicidade do extrato vegetal pelo bioensaio com a *Artemia sp* é avaliada através da dose letal (DL50) responsável por matar 50% das *Artemias*, que é calculada considerando o número de vida e morte. O extrato é considerado tóxico quando apresenta uma DL50 menor 1000 µg/mL (MEYER *et al.*, 1982; OGIDI *et al.*, 2018)(HAMIDI; JAVANOVA; PANOVSKA, 2014; MEYER *et al.*, 1982; OGIDI *et al.*, 2018).

Os ensaios toxicológicos são de grande importância para o prosseguimento de pesquisas que avaliam os extratos vegetais com potencial terapêutico. Estudos como o de Carvalho *et al.*,

2009 demonstram que o teste de toxicidade frente à *Artemia salina* constitui um modelo de baixo custo e prático para análises de substâncias tóxicas devido a sua alta sensibilidade a quaisquer alterações do meio (CARVALHO *et al.*, 2009).

O MS tem estabelecido políticas que incentivam o desenvolvimento de estudos com plantas medicinais com o objetivo de colocar em prática os benefícios vindos destas pesquisas e melhorar as condições que garantam a qualidade e segurança do uso de produtos naturais para cuidados com a saúde (FRANCO, 2003). As pesquisas podem contribuir para a inclusão de drogas seguras e eficazes no combate de diversas patologias (MARTINS; GARLET, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade na ação antibacteriana da *Piptadenia gonoacantha*.

3.2. Objetivos Específicos

- Correlacionar o diâmetro das árvores e a estação do ano com a atividade antibacteriana do extrato das folhas da *P. gonoacantha*;
- Realizar um *screening* antibacteriano dos extratos das folhas de *P. gonoacantha*;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos extratos das folhas da *P. gonoacantha*, frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas;
- Realizar o teste da toxicidade *in vitro* dos extratos das folhas da *P. gonoacantha* frente a *Artemia salina*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

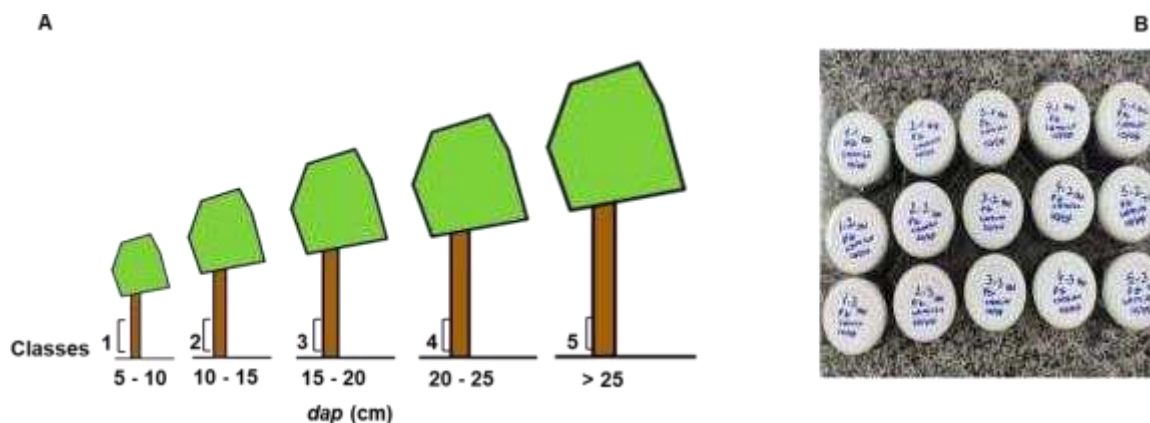
Estudo experimental *in vitro* que foi desenvolvido através da adaptação do método de difusão em meio sólido com perfuração em ágar.

4.1. Preparo das amostras

O material vegetal foi coletado no Centro Tecnológico de Viçosa – MG (CENTEV), com coordenadas geográficas 42° 51' W e 20° 42' S (TORRES *et al.*, 2013) e altitude média de 721 m (FARIA, 2021). Foram selecionadas três árvores por cada classe de *dap* (“Diâmetro à Altura do Peito”), sendo elas: classe 1 (5 a 10 cm), classe 2 (10 a 15 cm), classe 3 (15 a 20 cm), classe 4 (20 a 25 cm) e classe 5 (> 25 cm) (Figura 2 A). De cada árvore foi coletada folhas e pecíolos de Pau Jacaré (*Piptadenia gonoacantha*). A coleta foi igualmente repetida nas quatro estações climáticas. Após a coleta, as folhas foram secas em estufa de ar circulante a 60 °C por três dias e trituradas em moinho de facas (FARIA, 2021).

Para o preparo dos extratos utilizou-se o pó dos folíolos de *Piptadenia gonoacantha*, na relação de 1:5 (25 g pó: 125 mL de solução etanol/água 80% v/v com 0,3% ácido cítrico), resultando na concentração de 20% de extrato seco (m/v). Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de maceração por 48 horas à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a filtragem em filtro de papel, onde o filtrado recolhido será armazenado na temperatura de 2-8 °C em frasco âmbar protegido da luz. O resíduo sólido retido no filtro, foi submetido a extração por maceração por mais duas vezes com a mesma solução extratora. Ao final do processo, os filtrados foram reunidos em frasco âmbar e ao abrigo da luz para ser realizado o processo de retirada do solvente. A rotaevaporação foi realizada em evaporador rotativo (BUCHI®) a temperatura de 60°C com o auxílio de bomba de vácuo (FRANCO, 2018) (Figura 2, B).

Figura 2 – Coleta e preparo das amostras. A: Classificação diamétrica das árvores; B: Identificação dos extratos de *Piptadenia gonoacantha*.



Fonte: A – Elaboração própria; B – Extratos obtidos na pesquisa (2021).

4.2. Preparo do meio de cultura e das bactérias

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa - MG. As linhagens utilizadas foram de bactérias Gram positiva de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615) e de bactérias Gram negativa de *Escherichia coli* (ATCC 14948) e *Salmonella ssp* (ATCC 14028) e *Pseudomonas putida* (WFCC 885).

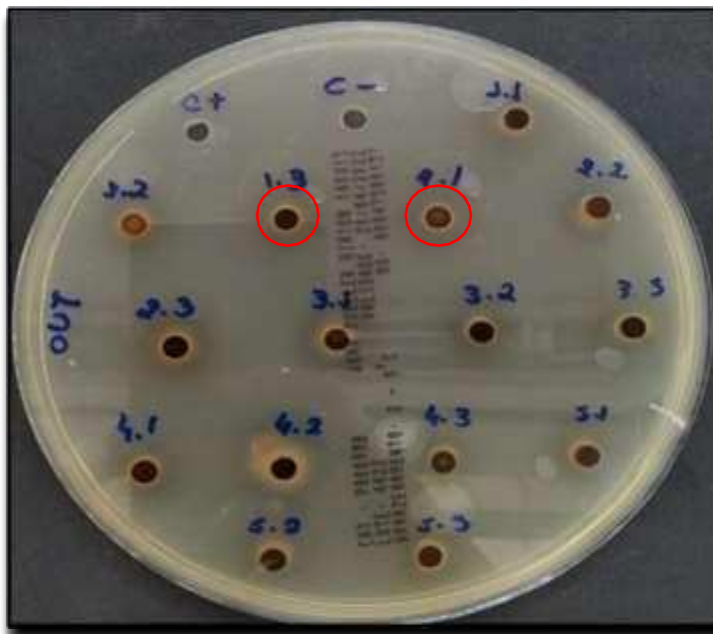
O meio de cultura empregado nos testes foi o Mueller-Hinton (Himedia®) e preparado segundo as especificações do fabricante. Antes dos testes, as linhagens foram replicadas para o meio citado e incubadas a 30 ± 2 °C por 24 h, esse processo foi repetido por mais 24 horas. A partir de culturas recentes, seguiu o preparo das suspensões bacterianas com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL) (NCCLS, 2003). O controle da absorvância dessas suspensões de microrganismos foi realizado com a leitura em espectrofotômetro ajustada para o comprimento de onda de 625 nm.

4.3. Atividade antibacteriana

Para a realização da atividade antibacteriana, 2 mL da suspensão do microrganismo ($1,5 \times 10^8$ células/mL) foi vertido em placas de Petri estéreis com ágar Mueller-Hinton com diâmetro 140 mm. Os poços foram confeccionados após a absorção completa das bactérias no meio de cultura, utilizando-se um bisturi circular. Em cada poço foi depositado 20µL dos extratos e dos controles nas cavidades correspondentes a cada um. Após a incubação por 24 horas, em estufa a 30 ± 2 °C, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm (Figura 3). Como controle negativo utilizou-se o álcool etílico 80% + 0,3% ácido cítrico, o mesmo utilizado para a preparação dos extratos, além do controle positivo Eritromicina $0,33 \times 10^{-3}$ mg/mL (Pharmanostra®) para as bactérias Gram positivas e Ciprofloxacino $0,41 \times 10^{-4}$ mg/mL (Ciprobacter®) para bactérias Gram negativas.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas, e como susceptível halo igual ou acima de oito mm de diâmetro (PAREKH; CHANDA, 2007; SANTOS *et al.*, 2007).

Figura 3 – Halos de inibição da atividade antibacteriana do extrato de *Piptadenia gonoacantha* por difusão em ágar frente à bactéria *Staphylococcus aureus* na estação de outono. Circulos vermelhos demonstrando os halos de inibição bacteriana.



Fonte: Resultados da pesquisa, 2022.

4.4. Determinação da concentração inibitória mínima

Após a avaliação preliminar da atividade antibacteriana das cepas, aquelas que apresentaram resultados satisfatórios foram selecionadas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

Para realização da CIM, foi utilizado o método de microdiluição em caldo. Somente os extratos da classe 1 (1.1, 1.2 e 1.3) da estação inverno foram selecionados para esse teste, e preparou-se um *pool* com as triplicatas. Partindo da concentração mais alta do extrato (500 mg/mL), foram preparadas diluições seriadas em meio Muler Hinton estéril, tendo uma faixa de concentração de 500 mg/mL a 3,9 mg/mL.

O preparo das placas de Petri com ágar Muler Hinton e a suspensão bacteriana seguiram a mesma metodologia empregada na atividade antibacteriana.

Posteriormente, 20 μ L de cada diluição de extrato foi transferido para os respectivos poços, bem como, o controle positivo e o controle negativo. As placas foram incubadas a 30 ± 2 °C por 24 horas. A avaliação da atividade antimicrobiana foi analisada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das cavidades padronizadas. Sendo considerada a CIM como a mais alta diluição de extrato de *Piptadenia gonoacantha* (EPG), que inibe o crescimento dos microrganismos (NCCLS, 2003).

4.5. Avaliação da toxicidade do extrato de *Piptadenia gonoacantha*

A avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico de EPG foi realizado frente a *Artemia salina* Leach, baseado no método modificado proposto por Meyer *et al.* (1982). Os ovos de *Artemia salina* Leach foram incubados ($10 \text{ mg} \times 100 \text{ mL}^{-1}$) por 48 horas em solução de NaCl (26 g/L), sob iluminação artificial e aeração constante a $26 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, obtendo-se a eclosão dos ovos e a formação das larvas em estágio metanúplio.

Posteriormente, foi realizada a diluição seriada do EPG com solução de NaCl (26 g/L) em diferentes concentrações (500×10^3 a $15,75 \times 10^3 \mu\text{g/mL}$). Em uma placa com 18 poços, foi adicionado 1 mL das diferentes diluições e 10 larvas de *Artemia salina* em cada poço. Após a incubação, por 24 horas, o número de larvas que permaneciam vivas foi avaliado.

Como controle negativo foi utilizado solução salina e, como controle positivo solução salina e dicromato de potássio (0,33 mM). A contagem do número de larvas vivas foi utilizada para formular o cálculo da DL50 (dose letal) por análise estatística.

Figura 4 – Avaliação da toxicidade do extrato de *P. gonoacantha* frente a *Artemia salina*. (A) Eclosão dos ovos de *Artemia salina*; (B) Ensaio de toxicidade das amostras em diferentes concentrações.



Fonte: Resultados da pesquisa, 2022.

4.6. Metodologia estatística

Uma análise estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a formação de halos nas unidades de amostra das quatro estações do ano e o teste *t* de Student, para amostras independentes, foi utilizado para avaliar o efeito do porte da árvore (classe de *dap*) na formação do halo. Esse teste foi aplicado para cada bactéria em cada estação do ano, considerando um nível de significância de 5%, para avaliar a hipótese de igualdade entre as médias de uma variável dependente (paramétrica) estimada para dois grupos independentes (categórica) (DARSKI *et al.*, 2020). A variável analisada foi o tamanho dos halos de inibição observados em cinco classes de estádios fenológicos de crescimento.

A proporção de casos com formação de halos de tamanho maior ou igual a 8 mm foi determinada para cada bactéria em cada estação do ano. Essas proporções foram calculadas independentemente da classe de diâmetro, o que resultou em 45 observações para cada bactéria nas estações outono, verão e inverno, e 30 para cada bactéria na estação primavera.

Com o objetivo de complementar a análise descritiva dessas proporções, foi calculado o p -valor do teste Z , que assumiu proporções populacionais de 0,05 e 0,95 na hipótese de nulidade. Se as condições $np \geq 5$ e $nq \geq 5$ fossem satisfeitas, a partir de uma amostra não estratificada, em que a variável analisada apresentasse apenas duas alternativas possíveis, nesse caso, sucesso ou insucesso, logo, a distribuição binomial das proporções amostrais poderia ser aproximada por uma distribuição normal com média $\mu = np$ e $\sigma = \sqrt{npq}$. Nesse caso a estatística $z = (\hat{p} - p) / \sqrt{pq/n}$ pode ser utilizada para testar a hipótese $H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$, sendo p a proporção de casos de “sucesso” (neste caso, halo > 8 mm), $q = 1 - p$, n é o tamanho da amostra e θ é a proporção populacional usada na hipótese de nulidade. \hat{p} indica a proporção amostral, ou seja, razão entre a quantidade de sucessos e o tamanho da amostra.

O tamanho do halo foi medido em 45 unidades de amostra ($n = 45$) para cada bactéria (*P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes*) e estação do ano (primavera, verão, outono e inverno). Para cada um desses 12 casos foram calculadas as proporções de casos em que o tamanho do halo fosse maior ou igual a 8,0 mm (p). Em seguida foram testadas as hipóteses $H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$, sendo p a proporção de casos com halo ≥ 8 mm e θ é a referência paramétrica, fixada desde 0,05 até 0,95.

5 RESULTADOS

Em consonância às recomendações do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS), os resultados do presente estudo serão apresentados em forma de artigo científico e uma cartilha. O artigo contendo os resultados sobre a ação antibacteriana do extrato da planta *Piptadenia gonoacantha* em relação a influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade foi submetido para Revista de Medicina Tropical com fator de impacto de 1,49 e Qualis B1 Medicina I. O produto técnico foi a elaboração de uma cartilha informativa destinada para capacitação de profissionais (médicos da família, pesquisadores) e usuários de plantas para fins medicinais, enfatizando a relação das estações climáticas e crescimento do vegetal na eficácia e segurança de sua utilização e a importância como alternativa de novos agentes antimicrobianos. O material em forma de cartilha possibilita oportunidades para o planejamento de ações e maior alcance das informações relatadas.

5.1. Artigo 1

Influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade de *Piptadenia gonoacantha* na produção de novos agentes antibacterianos para a saúde

MENDES, Gisele Carvalho; MELO, Ana Luiza Dias dos Santos; ULHOA, Luísa Barbosa; SEDIYAMA, Catarina Maria Nogueira de Oliveira; AMARO, Marilane de Oliveira Fani; LEITE, Helio Garcia; PAIVA, Haroldo Nogueira de ROSA, Marcelo Barcellos da; CARVALHO, Camilo Amaro de.

1Farmacêutica. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: gisele.mendes@ufv.br

2Discente da graduação em medicina. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: ana.melo2@ufv.br

3Discente da graduação em Medicina. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: luisa.ulhoa@ufv.br

4Médica. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: catarina.oliveira@ufv.br

5Enfermeira. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: marilane.amaro@ufv.br

6Engenheiro Florestal. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: hgleite@ufv.br

7Engenheiro Florestal. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: hnpaiva@ufv.br

8Químico. Universidade Federal de Santa Maria. E-mail: marcelo.b.rosa@ufsm.br

9Farmacêutico. Universidade Federal de Viçosa. E-mail: camilo.carvalho@ufv.br

Palavras-chave: Antimicrobianos; Plantas Medicinais; Estações Climáticas; Testes de Sensibilidade Microbiana; Testes de toxicidade.

RESUMO

Introdução: A resistência microbiana vem se destacando mundialmente no âmbito da saúde pública, uma vez que, o aumento acelerado de microrganismos multirresistentes não é acompanhado pelo desenvolvimento de drogas para o seu tratamento. **Método:** Utilizando o teste de difusão em ágar poço, foi avaliada a atividade antibacteriana de extratos das folhas da *P. gonoacantha* colhidas durante as quatro estações climáticas e de acordo com cinco classes diamétricas das árvores. Os testes foram realizados frente a bactérias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella ssp* e *Pseudomonas putida*) e Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*). A efetividade foi comprovada com a mensuração dos halos de inibição, sendo considerados os halos ≥ 8 mm como tendo ação antibacteriana. Para verificar a ação toxicológica do extrato que demonstrou melhor atividade antibacteriana, foi adotado o teste com *Artemia salina*. **Resultados:** As amostras coletadas em árvores no primeiro estágio fenológico de crescimento (classe 1- 5 a 10 cm) na estação inverno, revelaram os maiores halos de inibição bacteriana frente a *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* e atoxicidade frente a *Artemia salina*. **Conclusões:** A coleta de biomassa de folhas de *Piptadenia gonoacantha* para a produção do extrato deve ser realizada no inverno, onde foi verificada a melhor atividade antibacteriana e atoxicidade frente a *A. salina*. Os extratos da espécie em estudo possuem atividade antibacteriana satisfatória para bactérias de extrema importância clínica e baixa toxicidade, sendo promissores para novos agentes farmacológicos.

INTRODUÇÃO

A busca por ativos farmacológicos com ação antimicrobiana vem crescendo à medida que microrganismos resistentes ameaçam a eficiência da terapêutica disponível.¹ Organizações como OMS (Organização Mundial de Saúde) e a ANVISA (Agência de Vigilância Sanitária) alertam sobre picos de crescimento da resistência microbiana, evidenciando a necessidade da mudança de conduta, em relação a utilização de agentes antimicrobianos, tanto na sociedade civil, como por profissionais da área de saúde, agrícola e pecuária. Portanto, ações devem ser tomadas para reduzir o desenvolvimento da resistência antimicrobiana, como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor entendimento dos mecanismos genéticos de resistência e dar continuidade a estudos de desenvolvimento de novos fármacos, sejam elas sintéticos ou naturais.²

Nos últimos anos, diversos estudos foram realizados em diferentes países para comprovar a eficácia de extratos vegetais e fitoquímicos, ambos com propriedades antimicrobianas.² Portanto, o controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível durante todo o processo de desenvolvimento de um fitoterápico, pois muitas espécies vegetais são vendidas sem quaisquer garantias de qualidade, favorecendo, desde a venda de espécies falsificadas, até o armazenamento inadequado durante sua comercialização.³ Desta forma, se faz necessário alcançar uma compreensão mais precisa acerca do aprimoramento de novos fármacos de origem natural. Para tanto, deve se considerar desde o cultivo de espécies vegetais,

até a otimização e padronização de métodos de colheita do material vegetal utilizado na fabricação destas formulações. Evidências apontam que o teor e qualidade de compostos fenólicos dos tecidos vegetais podem ser afetados por muitos fatores, como genótipo, ambiente, estágio de crescimento da planta, época de colheita, condições de processo, armazenamento e métodos de análises.⁴⁻⁵ Corroborando com estes dados, um estudo realizado por Isah⁶ demonstra que sob a influência de fatores ambientais, processos fisiológicos celulares e de desenvolvimento de plantas são afetados, produzindo metabólitos secundários que desempenham uma variedade de papéis em resposta a estas mudanças. A sazonalidade é relatada como um fator contribuinte para a variação na produção de metabólitos secundários.⁷

Diante destes dados, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antibacteriana *in vitro* do extrato das folhas de *P. gonoacantha*, colhidas durante as quatro estações climáticas e em estádios fenológicos de crescimento distintos, bem como avaliar a toxicidade frente a *Artemia salina* do extrato mais promissor. Estes dados favorecerão para a padronização da época de colheita e validação da atividade biológica da espécie.

MÉTODOS

Estudo experimental *in vitro* desenvolvido através da adaptação do método de difusão em meio sólido com perfuração em ágar.

Coleta da planta e características do extrato

O material vegetal foi coletado no Centro Tecnológico de Viçosa – MG (CENTEV), com coordenadas geográficas 42° 51' W e 20° 42' S e altitude média de 721 m,8 em árvores de *Piptadenia gonoacantha*.

Foram selecionadas três árvores por cada classe de *dap* (diâmetro a 1,3 m de altura), com a finalidade de monitorar os estádios fenológicos de crescimento, sendo eles: *dap* 1 (5 a 10 cm), *dap* 2 (10 a 15 cm), *dap* 3 (15 a 20 cm), *dap* 4 (20 a 25 cm) e *dap* 5 (> 25 cm). Em cada classe de diâmetro foram identificadas e selecionadas três árvores para amostragem. De cada árvore foram retiradas três unidades de amostra de folhas. Este procedimento foi repetido nas quatro estações do ano. O extrato foi obtido a partir de folhas e pecíolos de Pau Jacaré (*Piptadenia gonoacantha*) e a coleta foi igualmente repetida nas quatro estações climáticas. Após a coleta, o material vegetal foi colocado em estufa de ar circulante a 60 °C por três dias e trituradas em moinho de facas.⁹

Para o preparo dos extratos, utilizou-se o pó das folhas e pecíolos, na relação de 1:5 (25 g pó: 125 mL de solução etanol/água 80% v/v com 0,3% ácido cítrico), resultando na

concentração de 20 % de extrato seco (m/v). Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de maceração por 48 h à temperatura ambiente. Após este período, foi realizada a filtração em papel de filtro, onde o filtrado recolhido foi armazenado na temperatura de 2 a 8 °C, em frasco âmbar protegido da luz. O sólido retido no filtro, foi submetido a extração por maceração por mais duas vezes com a mesma solução extratora. Ao final do processo, os filtrados foram submetidos ao processo de retirada do solvente que foi realizada em evaporador rotativo (BUCHI®) a temperatura de 60 °C com o auxílio de bomba de vácuo.¹⁰

Preparo do meio de cultura e das bactérias

Os microrganismos utilizados nos testes foram obtidos no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Medicina e Enfermagem da Universidade Federal de Viçosa - MG. As linhagens bacterianas utilizadas foram: Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615); Gram negativa *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Salmonella spp* (ATCC 14028) e *Pseudomonas putida* (WFCC 885).

O meio de cultura empregado nos testes foi o Mueller-Hinton (Himedia®), preparado segundo as especificações do fabricante. As culturas de bactérias foram mantidas a 4 °C em Mueller-Hinton. Antes dos testes, as linhagens foram replicadas para o meio citado e incubadas a 30 ± 2 °C por 24 h, sendo esse processo repetido por mais 24 h. A partir de culturas recentes foram preparadas as suspensões bacterianas, com turvação equivalente a Escala de McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/mL).¹¹

Atividade antibacteriana e Determinação da concentração inibitória mínima

Para a realização da atividade antibacteriana, 2 mL da suspensão do microrganismo ($1,5 \times 10^8$ células/mL) foi vertido em placas de Petri estéreis com ágar Mueller-Hinton. Em cada poço foram depositados 20 µL dos extratos e dos controles, nas cavidades correspondentes a cada um. Após a incubação por 24 h, em estufa a 30 ± 2 °C, o diâmetro do halo de inibição foi mensurado em mm.

Como controle negativo, utilizou-se o álcool etílico 80% em 0,3% ácido cítrico, o mesmo utilizado para a preparação dos extratos, além do controle positivo Eritromicina $0,33 \times 10^{-3}$ mg/mL (Pharmanostra®), para as bactérias Gram positivas, e Ciprofloxacino $0,41 \times 10^{-4}$ mg/mL (Ciprobacter®), para bactérias Gram negativas.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo considerado como resultado final de cada extrato a média das três medidas, e como susceptível halo igual ou acima de 8 mm de diâmetro.¹²⁻¹³

Após a avaliação preliminar da atividade antibacteriana das cepas, aquelas que apresentaram resultados satisfatórios foram selecionadas para determinar a concentração inibitória mínima (CIM).

Para realização da CIM, o extrato que revelou melhor atividade antibacteriana no *screening* foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo. Ou seja, foram selecionados os extratos preparados com o material coletado em árvores do primeiro estágio fenológico de crescimento (dap 1 - 5 a 10 cm), da estação inverno. Um pool com as triplicatas dos extratos classificados como dap 1 foi preparado. Partindo da concentração mais alta do extrato (500 mg/mL), foram preparadas diluições seriadas em meio Mueller-Hinton estéril, tendo uma faixa de concentração de 500 mg/mL a 3,9 mg/mL. O preparo das placas de Petri com ágar Mueller-Hinton e suspensão bacteriana seguiram a mesma metodologia empregada na avaliação da atividade antibacteriana. Posteriormente, 20 µL de cada diluição de extrato foi transferido para os respectivos poços, bem como, o controle positivo e o controle negativo. As placas foram incubadas a 30 ± 2 °C por 24 h. A avaliação da atividade antibacteriana foi analisada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das cavidades padronizadas. Sendo considerada a CIM como a mais alta diluição de extrato de *Piptadenia gonoacantha* (EPG), que inibe o crescimento dos microrganismos.¹¹

Avaliação da toxicidade do extrato de *Piptadenia gonoacantha*

A avaliação da toxicidade do extrato hidroalcoólico de *Piptadenia gonoacantha* (EPG) foi realizado frente a *Artemia salina* Leach, baseado no método modificado proposto por 14. Os ovos de *Artemia salina* Leach foram incubados ($10 \text{ mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) por 48 horas em solução de NaCl (26 g/L), sob iluminação artificial e aeração constante a 26 ± 1 °C, obtendo-se a eclosão dos ovos e a formação das larvas em estágio metanúplio. Os extratos da classe dap 1 da estação inverno foram selecionados para esse teste.

Posteriormente, foi realizada a diluição seriada do EPG com solução de NaCl (26 g/L) em diferentes concentrações (500×10^3 a $15,75 \times 10^3$ µg/ml). Em uma placa com 18 poços, foi adicionada 1 mL das diferentes diluições e 10 larvas de *Artemia salina* em cada poço. Após a incubação por 24 h, o número de larvas que permaneciam vivas foi avaliado.

Como controle negativo foi utilizado solução NaCl (26 g/L) e, como controle positivo, dicromato de potássio (0,33 mM) em solução salina.

Análise estatística dos dados

Uma análise estatística descritiva foi utilizada para caracterizar a formação de halos nas unidades de amostra das quatro estações do ano e o teste *t* de *Student*, para amostras

independentes, foi utilizado para avaliar o efeito do porte da árvore (classe de dap) na formação do halo. Esse teste foi aplicado para cada bactéria em cada estação do ano, considerando um nível de significância de 5%, para avaliar a hipótese de igualdade entre as médias de uma variável dependente (paramétrica) estimada para dois grupos independentes (categórica).¹⁵ A variável analisada foi o tamanho dos halos de inibição observados em cinco classes de estádios fenológicos de crescimento.

A proporção de casos com formação de halos de tamanho maior ou igual a 8 mm foi determinada para cada bactéria em cada estação do ano. Essas proporções foram calculadas independentemente da classe de diâmetro, o que resultou em 45 observações para cada bactéria nas estações outono, verão e inverno, e 30 para cada bactéria na estação primavera.

Com o objetivo de complementar a análise descritiva dessas proporções, foi calculado o p -valor do teste Z, que assumiu proporções populacionais de 0,05 e 0,95 na hipótese de nulidade. Se as condições $np \geq 5$ e $nq \geq 5$ fossem satisfeitas, a partir de uma amostra não estratificada, em que a variável analisada apresentasse apenas duas alternativas possíveis, nesse caso, sucesso ou insucesso, logo, a distribuição binomial das proporções amostrais poderia ser aproximada por uma distribuição normal com média $\mu = np$ e $\sigma = \sqrt{npq}$. Nesse caso a estatística $z = (\hat{p} - p) / \sqrt{pq/n}$ pode ser utilizada para testar a hipótese $H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$, sendo p a proporção de casos de “sucesso” (neste caso, halo > 8 mm), $q = 1 - p$, n é o tamanho da amostra e θ é a proporção populacional usada na hipótese de nulidade. \hat{p} indica a proporção amostral, ou seja, razão entre a quantidade de sucessos e o tamanho da amostra.

O tamanho do halo foi medido em 45 unidades de amostra ($n = 45$) para cada bactéria (*P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes*) e estação do ano (primavera, verão, outono e inverno). Para cada um desses 12 casos foram calculadas as proporções de casos em que o tamanho do halo fosse maior ou igual a 8,0 mm (p). Em seguida foram testadas as hipóteses $H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$, sendo p a proporção de casos com halo ≥ 8 mm é a referência paramétrica, fixada desde 0,05 até 0,95.

RESULTADOS

A atividade antibacteriana do extrato foi testada em cinco cepas bacterianas distintas. O material vegetal foi coletado em triplicata nas quatro estações climáticas e em cinco classes de diâmetro (estádios fenológicos de crescimento), resultando em 45 amostras de extratos para as estações verão, outono e inverno. Na estação primavera, obteve-se apenas 30 amostras de extratos devido a coleta ter sido realizada em duplicata. Na avaliação dos resultados, o extrato em teste, apresentou atividade microbiana satisfatória nas diferentes estações do ano. O extrato

das folhas extraído no outono e no verão, respectivamente, teve uma eficácia menor frente a cultura de *Streptococcus pyogenes*, já frente a *Pseudomonas putida* obteve apenas 4% de eficácia no outono, ou seja, a ação antibacteriana independe da estação do ano em que são coletadas as folhas. Em contrapartida, não apresentou eficiência frente a bactéria *S. aureus*, nas estações verão e outono. As análises descritivas, que descrevem e caracterizam a formação de halos nas amostras para as quatro estações do ano, estão apresentadas na Figura 1.

Com relação as classes de diâmetro e as estações do ano, os resultados sugerem que o extrato com melhor atividade antibacteriana seria aquele cujas folhas fossem colhidas no inverno com as árvores na classe 1 ($5 \leq dap \leq 10$ cm), já que apresentaram halos de inibição $\geq 8,0$ mm em maior quantidade se comparado as demais.

A Figura 1 contém as análises para cada uma das três bactérias avaliadas, em cada uma das estações do ano. Na Figura 2 são apresentadas as médias dos tamanhos dos halos de inibição bacteriana observados em cinco classes estádios fenológicos de crescimento de *P. gonoacantha* nas quatro estações e os resultados obtidos com a aplicação do teste t para amostras independentes. Os *p*-valores do teste *t* são apresentados e na Tabela 1.

Figura 1 – Tamanho dos halos de inibição bacteriana observados em cinco estádios fenológicos de crescimento (*dap*) de *P. gonoacantha* nas quatro estações. Os vetores-linha indicam os valores mínimo, médio e máximo de tamanho de halos.

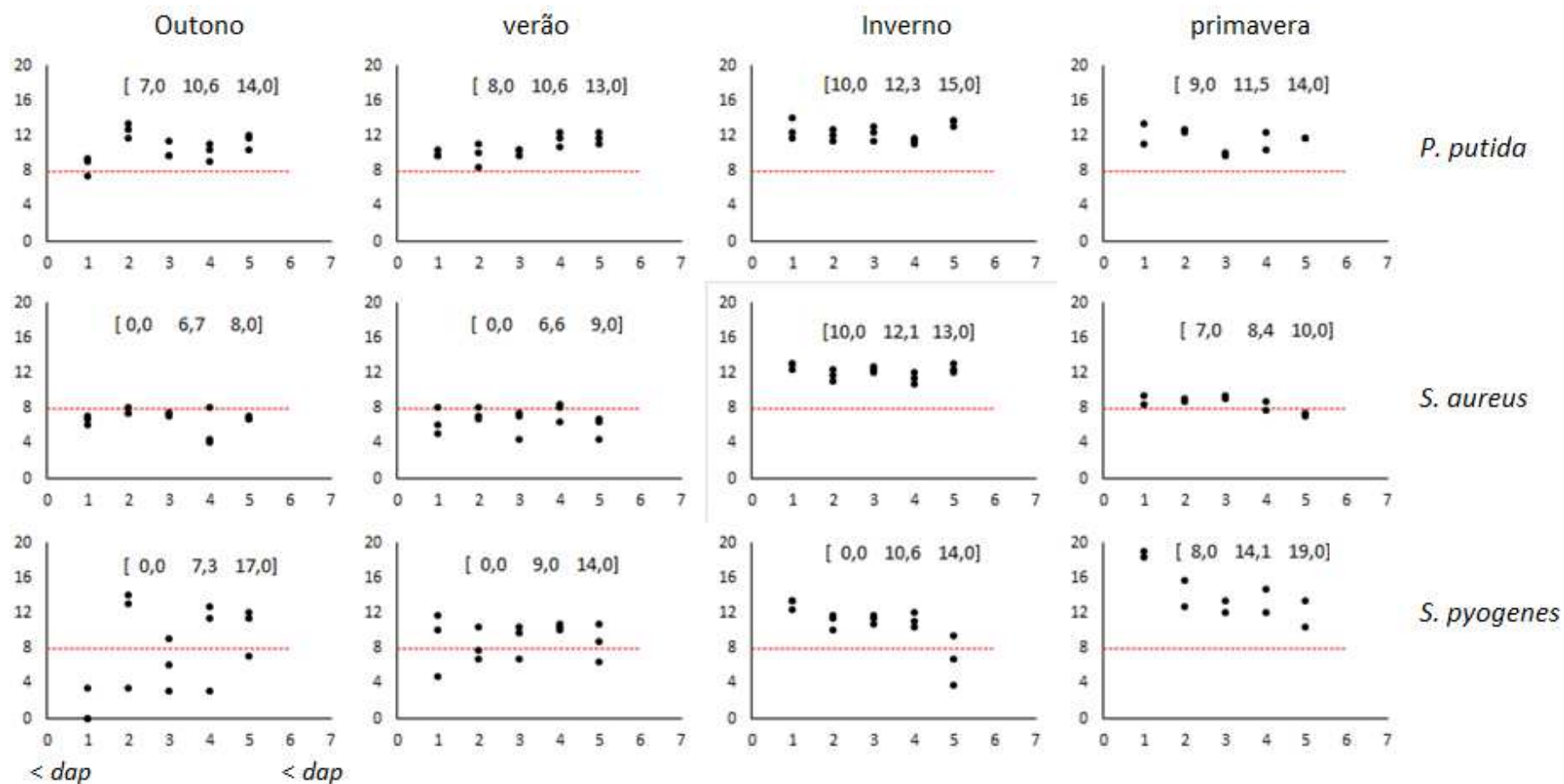


Figura 2 – Tamanho dos halos de inibição bacteriana observados em cinco classes estádios fenológicos de crescimento de *P. gonoacantha* nas quatro estações. As classes de *dap* 1 a 5, correspondem, respectivamente, a 5 a 10 cm de *dap*, 10 a 15 cm, 15 a 20 cm, 20 a 25 cm e *dap* > 25 cm. Médias com mesma letra não diferem pelo teste t para amostras independentes ($p > 0,05$).

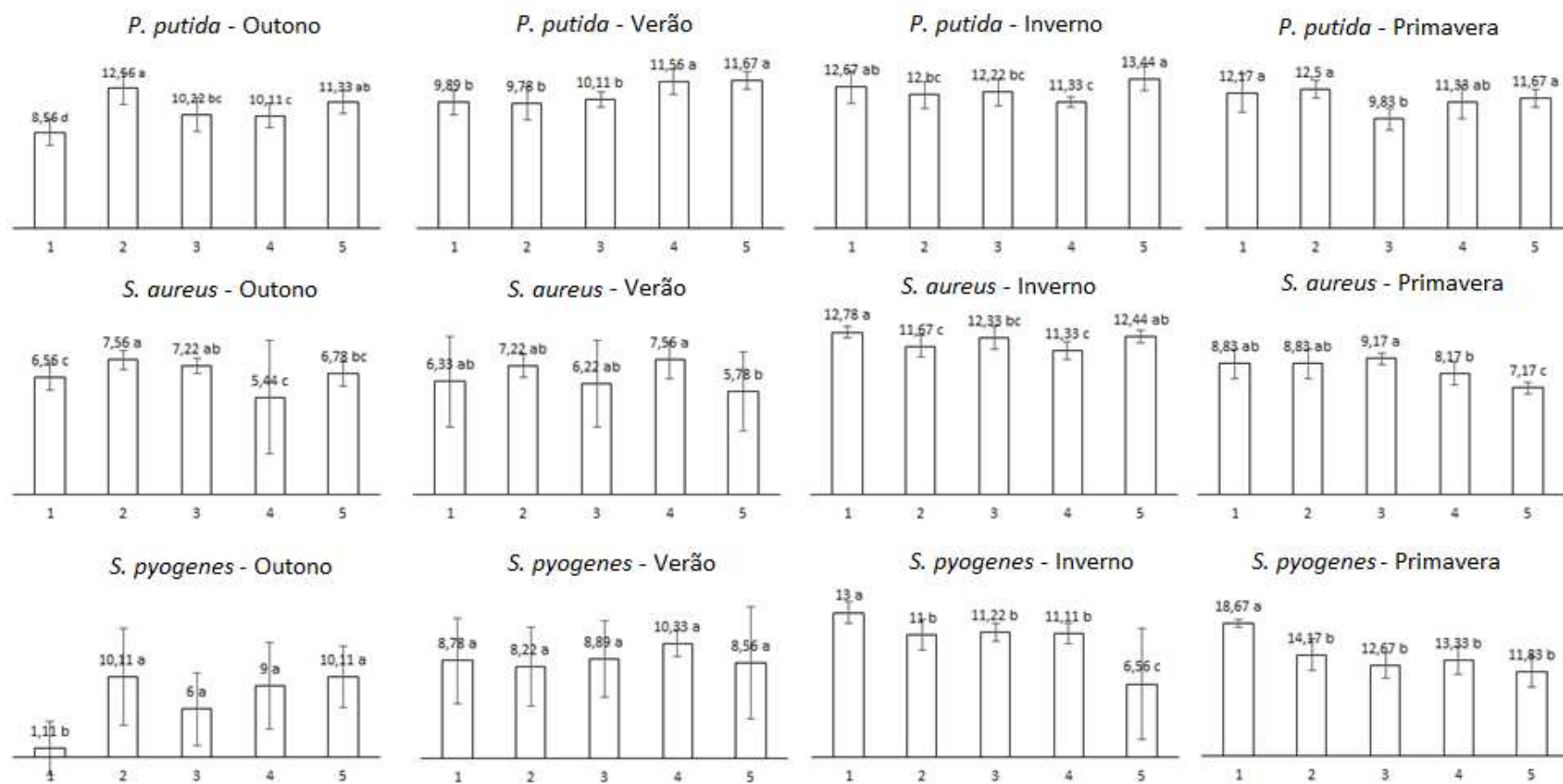


Tabela 1 – *p*-valores para o teste *t* para amostras independentes aplicado para avaliar o efeito estádio de crescimento (1 a 5) da *P. gonoacantha* no tamanho do halo inibição bacteriana de *P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes* nas quatro estações do ano.

Bactéria	Outono					Verão				
	<i>Dap</i>	2	3	4	5	2	3	4	5	
<i>P. putida</i>	1	0,0000	0,0163	0,0081	0,0000	0,8375	0,5549	0,0022	0,0003	
	2		0,0036	0,0008	0,0512		0,4955	0,0052	0,0015	
	3			0,8568	0,0806			0,0020	0,0001	
	4				0,0226				0,7909	
<i>S. aureus</i>	1	0,0041	0,0317	0,3257	0,5086	0,3266	0,9259	0,2001	0,6289	
	2		0,1649	0,0690	0,0144		0,2526	0,4220	0,0804	
	3			0,1188	0,1147			0,1493	0,6915	
	4				0,2396				0,0443	
<i>S. pyogenes</i>	1	0,0014	0,0194	0,0019	0,0001	0,7543	0,9495	0,2667	0,9178	
	2		0,1267	0,6906	1,0000		0,6904	0,1092	0,8731	
	3			0,2235	0,0569			0,2531	0,8721	
	4				0,6264				0,3202	
		Inverno				Primavera				
		2	3	4	5	2	3	4	5	
<i>P. putida</i>	1	0,3009	0,4829	0,0169	0,2158	0,6788	0,0163	0,3932	0,5350	
	2		0,7028	0,1501	0,0193		0,0005	0,1281	0,1114	
	3			0,0573	0,0410			0,0683	0,0056	
	4				0,0001				0,6438	
<i>S. aureus</i>	1	0,0034	0,1890	0,0001	0,1649	1,0000	0,4608	0,2167	0,0033	
	2		0,1220	0,3844	0,0351		0,4608	0,2167	0,0033	
	3			0,0163	0,7466			0,0169	0,0000	
	4				0,0016				0,0169	
<i>S. pyogenes</i>	1	0,0032	0,0008	0,0007	0,0015	0,0007	0,0000	0,0001	0,0000	
	2		0,6900	0,8463	0,0203		0,2240	0,5078	0,0939	
	3			0,7927	0,0136			0,5490	0,4770	
				0,0158				0,2345		

Em negrito são os casos com rejeição da hipótese de nulidade para 5% de significância, ($p \leq 0,05$).

Os resultados do teste *t* corroboram com a análise descritiva, realizada previamente, em que a primeira classe de diâmetro (*dap* 1) é mais significativa, e que a colheita das folhas para o extrato deve ser evitada nas estações verão e outono para a inibição de cepa bacterianas de *S. aureus*. Na Tabela 2 são apresentadas as proporções de casos em que o tamanho do halo

foi superior a 8 mm (p).

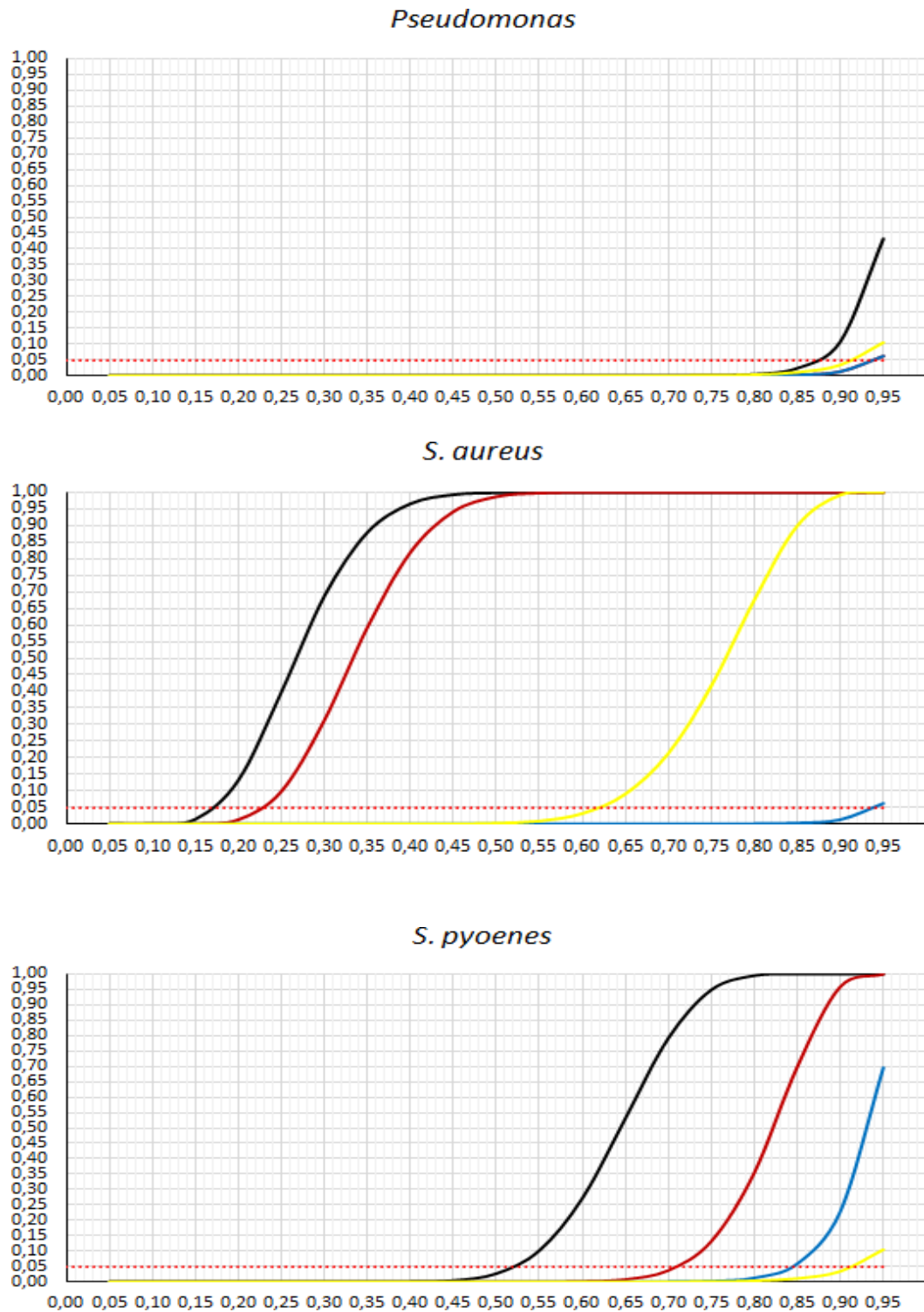
Tabela 2 – Proporção de casos com halo > 8 mm (p) e de casos com halo ≤ 8 mm (q), para as bactérias *P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes* nas quatro estações do ano.

Bactéria	Estação	Insucesso (≤ 8 mm)	Sucesso (> 8 mm)	Total	p	q
<i>P. putida</i>	Outono	2	43	45	0,9556	0,0444
	Verão	0	45	45	1,0000	0,0000
	Inverno	0	45	45	1,0000	0,0000
	Primavera	0	30	30	1,0000	0,0000
<i>S. aureus</i>	Outono	33	12	45	0,2667	0,7333
	Verão	30	15	45	0,3333	0,6667
	Inverno	0	45	45	1,0000	0,0000
	Primavera	7	23	30	0,7667	0,2333
<i>S. pyogenes</i>	Outono	16	29	45	0,6444	0,3556
	Verão	8	37	45	0,8222	0,1778
	Inverno	3	42	45	0,9333	0,0667
	Primavera	0	30	30	1,0000	0,0000

Fonte: Resultados da pesquisa, 2022.

A estatística do teste (z) foi calculada para cada combinação bactéria e estação do ano, sendo estimado o *p*-valor para cada hipótese avaliada ($H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$). O resultado dessas análises está na Figura 3.

Figura 3 – Estatística do teste Z para cada combinação atividade antibacteriana frente a *P. putida*, *S. aureus* e *S. pyogenes* e a influência da estação do ano.



Nota: Estimativas de p -valor (eixo y) para a hipótese $H_0: p = \theta$ versus $H_1: p > \theta$, sendo p a proporção de casos com halo ≥ 8 mm e θ é a referência paramétrica (eixo x). Linha pontilhada é o nível de significância para H_0 avaliada pela estatística $\overline{Z} = (p - \theta) / \sqrt{pq/n}$. As cores das curvas indicam: outono (preto), verão (vermelho), inverno (azul) primavera (amarelo).

Considerando um valor paramétrico $\theta = 50\%$, e que a hipótese do teste é de nulidade, ou seja, com fins de rejeição, com base na linha de referência de 5% de significância (linha vermelha pontilhada), verifica-se que a hipótese nula é rejeitada para *P. putida* e para *S. pyogenes*, em qualquer estação do ano ($p\text{-valor} \leq 0,05$). Portanto as folhas de *P. gonoacantha* podem ser colhidas em qualquer estação do ano. A rejeição de H_0 ocorreu, também, para *S. aureus* nas estações inverno e primavera. Portanto, se a proporção de casos de efetividade (halo $\geq 8,0$ mm) igual ou menos a 50% não for suficiente, a coleta de biomassa de folhas do Pau Jacaré deveria ser evitada nas estações outono e verão, para o caso de produção de extratos para terapias onde há colonização por *S. aureus*.

Foi realizado o teste para verificar a concentração inibitória mínima com o extrato coletado na estação inverno, da classe diamétrica 1, devido à melhor atividade antibacteriana. A CIM do extrato frente às três bactérias foi definida como a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento da bactéria, ou seja, em que não houve a formação de halo de inibição. O extrato de *Piptadenia gonoacantha* apresentou uma CIM igual a 62,5 mg/mL frente à bactéria *S. aureus*, 15,62 mg/mL para a *S. pyogenes* e 31,25 mg/mL para *P. putida*.

Além disso, realizou-se a avaliação da toxicidade do extrato de *Piptadenia gonoacantha* frente a *Artemia salina*. Através da regressão linear obtida pela porcentagem de larvas mortas e a concentração do extrato de *Piptadenia gonoacantha*, foi estimada uma DL_{50} de $243,78 \cdot 10^3 \mu\text{g/ml}$. Por meio dos resultados podemos inferir que o extrato da espécie em estudo não apresenta valores tóxicos, uma vez que, o valor da dose letal média para *Artemia salina* estava abaixo do limite de referência que é acima de $1000 \mu\text{g/mL}^{10}$ (Figura 2). O extrato pesquisado apresenta um efeito antibacteriano em doses não tóxicas, pois os valores estão muito abaixo da dose letal calculada no teste de toxicidade.

DISCUSSÃO

Piptadenia gonoacantha é uma espécie arbórea, da família Fabaceae, com rápido crescimento foliar, nativa da Mata Atlântica no sul e sudeste do Brasil. Popularmente a espécie estudada é conhecida como “pau jacaré”. Em estudos anteriores com extratos da espécie, foi verificado seu potencial inibitório do crescimento frente a microrganismo e ação anti-inflamatório.¹⁶

Neste trabalho, foram estudadas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, como parte do esforço recorrente entre os cientistas de encontrar alternativas viáveis para a inibição da ação antimicrobiana. Tal esforço é necessário, uma vez que, a OMS divulgou em 2017, uma lista de bactérias que necessitam urgentemente de novos antibióticos.¹¹

Nas últimas duas décadas, apenas duas novas classes de antibióticos foram desenvolvidas e autorizadas por agências de saúde internacionais e ambas são direcionadas para o combate de bactérias Gram-positivas. A última classe de antibióticos descobertas que são efetivas contra bactérias Gram- negativas foram descobertas em 1962.¹² Assim, estudos como este são importantes por trazer novas possibilidades ao tratamento tradicional, haja vista que os fitoterápicos expandem os recursos terapêuticos oferecidos aos pacientes, muitas vezes, por um custo mais baixo.¹⁷

Na lista divulgada pela OMS, se encontra uma das bactérias desse estudo, a *Staphylococcus aureus*, classificada como prioridade alta para a descoberta de novos antibióticos. Ou seja, a literatura sugere que para esta bactéria seja difícil encontrar antibióticos eficazes. Isto é corroborado pelos resultados aqui encontrados, haja vista que foi a bactéria em que o extrato teve sucesso em apenas uma estação do ano.¹¹ Corroborando à dificuldade de se encontrar antibióticos com eficácia frente a *Staphylococcus aureus*, os resultados desse trabalho identificaram esta bactéria como aquela mais exigente para a produção de um extrato que seja eficaz na ação antimicrobiana.

Os resultados para *S. aureus* são corroborados pelo trabalho¹⁸, que evidenciou a eficácia de diferentes formulações contendo extratos de *Piptadenia gonoacantha* na inibição desta bactéria. Importa destacar, que as bactérias analisadas neste trabalho, que apresentaram sensibilidade frente ao extrato estudado, são causadoras de infecções cutâneas.¹⁹ Logo, considerando que houve inibição antimicrobiana considerável, as evidências reportadas por¹⁸, corroboram os resultados aqui encontrados.

Os constituintes bioativos mais reconhecidos por seus efeitos antimicrobianos são os compostos fenólicos, flavonóides, taninos, terpenóides e os compostos quinônicos.²⁰ Dentre eles destaca-se a rutina, um flavonoíde, que é extensamente encontrada na natureza, inclusive em quantidade considerável nas folhas da *P. gonoacantha*. Este composto apresenta diversos efeitos biológicos relatados na literatura, tais como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, vasodilatadora e citoprotetora^{21,22,10}.

Diversos trabalhos estão sendo realizados em busca de compostos farmacológicos e alternativas naturais com atividade antimicrobiana para o tratamento de lesões e cicatrização, explorando a diversidade de plantas e seu potencial terapêutico.^{23,24,25} Estudos²⁶ avaliaram a atividade antibacteriana do extrato de *Qualea parviflora* Mart. (Pau-terra) e do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), e Guimarães et al. (2017)²⁷ avaliaram do *Caryophyllus aromaticus* L. (cravo-da-índia), ambos estudos verificando a capacidade frente às cepas Gram-negativas e Gram-positivas. Os dois estudos mostraram a capacidade inibitória desses extratos

sobre o crescimento das cepas avaliadas. Corroborando com que novos medicamentos, de origem natural, sejam considerados como opções terapêuticas importantes²⁸.

Foram encontrados resultados para a efetividade dos extratos de *Piptadenia gonoacantha* frente as bactérias *S. pyogenes* e *P. putida*. No entanto, há estudos que evidenciam concentração inibitória satisfatória dessas bactérias utilizando plantas medicinais, como a utilização de *Passiflora edulis*, que apresentou atividade antibacteriana contra a bactéria *S. pyogenes*²⁹, e a *Passiflora foetida*, que apresentou bons resultados antibacterianos tanto contra a *P. putida* quanto contra a *S. Pyogenes*.³⁰

Com relação a classe de diâmetro estabelecida para colheita das folhas, os resultados indicam a classe 1 (5 a 10 cm) como sendo a de maior eficiência na inibição do crescimento bacteriano. Ou seja, são indicadas árvores mais jovens com menor altura, o que por sua vez facilitaria o manejo durante o extrativismo sustentável. Caso fosse produzido em larga escala, não teria que esperar um longo tempo para realização da coleta, pouco tempo de crescimento, espaço reduzido no plantio, além de rápida regeneração natural, que são características importantes para escala industrial e reflorestamento com a espécie.¹³

Estudos anteriores com extratos de *P. gonoacantha*, após análises fitoquímicas, constatou que o flavonóide rutina estava entre os compostos de maior concentração no extrato. Avaliando a influência da sazonalidade, a estação verão apresentou maior concentração de rutina e a estação inverno a menor concentração em extratos hidroalcoólicos (80%) de *P. Gonoacantha*.⁹ Se compararmos com os resultados do trabalho de Faria (2021)⁹, podemos afirmar que a rutina não pode ser usada como marcador biológico para atividade antibacteriana do extrato estudado, já que na estação inverno foi observada a melhor atividade contra as bactérias testadas.

A toxicidade do extrato também foi avaliada, onde apresentou resultados dentro dos padrões esperados, uma vez que se o teste frente à *Artemia salina*, apontam valores abaixo de 500 µg/mL para substâncias tóxicas, de 500 µg/mL a 1000 µg/mL para toxicidade moderada e acima de 1000 µg/mL, atoxicidade. O material analisado se encontra nesta terceira categoria, sugerindo um produto não tóxico.¹⁵ Outros trabalhos com a espécie *P. gonoacantha* também asseguram a baixa toxicidade do extrato e de formulações a base das folhas de Pau Jacaré.^{31,17}

Os resultados referentes à ação da *Piptadenia gonoacantha* nas diferentes estações do ano, bem como a classe de diâmetro mais adequada para a colheita das folhas para o extrato são as principais contribuições deste trabalho, pois trata-se de um estudo com abordagem inédita. Além disso, foi utilizada cepas bacterianas de *P. putida* que possui escassos estudos com avaliação da ação de plantas medicinais em sua inibição.

CONCLUSÕES

Os extratos das folhas de *Piptadenia gonoacantha* apresentaram ação antibacteriana frente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, e *Pseudomonas putida*. Entretanto, não revelou resultados positivos frente as cepas de *Escherichia coli* e a *Salmonella*. A estação mais propícia para a colheita é o inverno, sendo *S. aureus* a espécie bacteriana em que o efeito da sazonalidade foi mais relevante. Dentre as classes de diâmetro avaliadas, a mais favorável foi a primeira, onde as árvores possuíam de 5 a 10 cm de *dap*. Isto demonstra uma possibilidade de colheita em um menor período de tempo, e em pequenos espaços, favorecendo a produção em larga escala e o reflorestamento da espécie.

Os resultados satisfatórios obtidos no estudo constituem em uma motivação para o início das etapas de validação pré-clínica do extrato como novos fármacos potenciais para o tratamento de processos infecciosos e inflamatórios cutâneos.

Este artigo é parte da dissertação de mestrado profissional de Gisele Carvalho Mendes pela Universidade Federal de Viçosa – UFV.

Referências

1. Kebede T, Gadisa E, Tufa A. Antimicrobial activities evaluation and phytochemical screening of some selected medicinal plants: A possible alternative in the treatment of multidrug-resistant microbes. PLoS One [Internet]. 2021 [cited 2022 Aug 2]; 16(3): 1-16. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249253>
2. Nascimento GG, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. Braz J Microbiol [Internet]. 2000 [cited 2022 Sep 21]; 31(4): 247-256. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
3. Carvalho CAD, Silva MBD, Oliveira TGD, Lima JDM, Rosa MBD. Estudo espectrométrico de diferentes estádios fenológicos da Brassica oleracea var. capitata. Braz J Pharmacog [Internet]. 2008 [cited 2022 Sep 21]; 18(2): 249-257. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>
4. Vagiri M, Conner S, Stewart D, Andersson SC, Verrall S, Johansson E, Rumpunen K. Phenolic compounds in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) leaves relative to leaf position and harvest date. Food Chem [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2021 Jun 1]; 172:135-42, Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.041>
5. Bujor OC, Ginies C, Popa VI, Dufour C. Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. Food Chem [Internet]. 2018 Jun 30 [cited 2021 May 31]; 252: 356-365, Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.052>

6. Isah T. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. Biol Res [Internet]. 2019 Jul 29 [cited 2021 Apr 9]; 52 (39):1-25. Available from: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>
7. Gobbo-Neto L, Lopes N P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quím Nova [Internet]. 2006 Oct 31 [cited 2021 Jun 1]; 30 (2): 374-381. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>
8. Souza LFT, Fernandes Filho EI, Faria MM. Compartimentação geomorfológica e mapeamento digital de solos no município de Viçosa–MG. Rev Geonorte [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 5]; 5(16): 110-114. Available from: <https://periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/1370>.
9. Faria, CA. Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de rutina em *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) JF Macbr. (FABACEAE) [master's thesis]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2021. 48p.
10. Franco AJ. JACBIO®: formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas à base de *Piptadenia gonoacantha* com atividade antimicrobiana e uso [master's thesis]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2018. 44p.
11. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M7-A6, 2nd ed., 2003.
12. Parekh J, Chanda S. In vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Some Indian Medicinal Plants, Turk J Biol [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 9]; 31(1):53-8. Available from: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol31/iss1/9>.
13. Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. In vitro antimicrobial activity of the extract of *Abaremacochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. Braz J. Pharmacogn [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 9]; 17(2): 215-9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200014>.
14. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DEJ, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med [Internet]. 1982 [cited 2022 Aug 14]; 45(05): 31-4. Available from: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>
15. Darski C, Kuhl CP, Terraciano PB, Nienov OH. Desfechos quantitativos: amostras independentes. In: Capp E, Nienov OH, editors. Bioestatística quantitativa aplicada. Porto Alegre: UFRGS; 2020. p. 125-156.
16. Carvalho CA. Caracterização Botânica, Fitoquímica e avaliação da Atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. macbr (fabaceae) [dissertation]. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2012. 71 p.
17. Paiva LC, Silva KV, Almeida GFG, Caldeira EAC, Cruz CESC, Salgado PO et al. *Piptadenia gonoacantha*-based natural dermocosmetic: a clinical trial. Ci e Nat [Internet]. 2021

[cited 2022 Sep 7]; 43: 1-31. Available from: <https://doi.org/10.5902/2179460X43676>

18. Franco AJ, Pereira CG, Silva KV, Almeida GFG, Amaro MDOF, Caldeira EAC et al. Antimicrobial activity of dermocosmetic formulations based on *Piptadenia gonoacantha*. *Ci e Nat* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 7]; 43: 1-31. Available from: <https://doi.org/10.5902/2179460X43704>.

19. Couto DS, Costa Perinoti LCS, Silva Felix AM, Figueiredo RM. Não conformidades no processo de administração de antimicrobianos: revisão integrativa. *Saúde Coletiva* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 21]; 11(64): 5702-5713. Available from: <https://doi.org/10.36489/saudecoletiva.2021v11i64p5702-5713>

20. Barbier F, Timsit JF. Risk stratification for multidrug-resistant bacteria in patients with skin and soft tissue infection. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. 2020 [cited 2022 Sep 9]; 33(2): 137-45. Available from: <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000642>

21. Couto DS, Costa Perinoti LCS, Silva Felix AM, Figueiredo RM. Não conformidades no processo de administração de antimicrobianos: revisão integrativa. *Saúde Coletiva* [Internet]. 2021 [cited 2022 Sep 21]; 11(64): 5702-5713. Available from: <https://doi.org/10.36489/saudecoletiva.2021v11i64p5702-5713>.

22. Araujo MEMB. Avaliação da atividade antioxidante e antiproliferativa da rutina e seus produtos obtidos por hidrólise enzimática [master's thesis]. Bragança Paulista: Universidade São Francisco; 2012. 78 p.

23. Macêdo IDSV, Cunha KG, Alves ATV, Martins RM, Silva Simões MO. Atividade antioxidante da rutina: uma revisão. *J Biol Pharm Agric Manag* 2018; 13(1).

24. Souza DR, Rodrigues ECAMS. Plantas medicinais: indicação de raizeiros para o tratamento de feridas. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*. 2016 [cited 2022 Sep 21]; 29(2):197-203, 2016. Available from: <https://doi.org/10.5020/18061230.2016.p197>

25. Ramalho MP et al. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: revisão de literatura. *Revista Expressão Católica Saúde*. 2018 [cited 2022 Sep 21]; 3(2): 64-70. Available from: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/recsaude/article/view/2429>

26. Baldé MA et al. Antimicrobial investigation of ethnobotanically selected guinean plant species. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020; 263: 113232.

27. Franczak DD et al. Atividade Antibacteriana dos Extratos Etanólicos do Caule e da Folha de *Qualea parviflora* Mart.(Pau-terra). *UNICIÊNCIAS*. 2019 [cited 2022 Sep 21]; 23(1): 43-47. Available from: <https://doi.org/10.17921/1415-5141.2019v23n1p43-47>

28. Guimarães CC t al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso e do óleo essencial do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e do cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L.) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. *Rev. Bras. Biociênc*. 2017; 15(2): 83-89.

29. Soares CRP, Oliveira-Júnior JB, Firmo EF. Primeiro relato de um gene resistente ao bla NDM em um isolado clínico de *Klebsiella aerogenes* do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54.
30. Silva SR, Souza FM, Espinheira MJCL. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial das sementes de *Passiflora edulis* Sims frente às bactérias Gram Positivas e Gram Negativas. ID on line. *Rev Mult Psic [Internet]*. 2019 [cited 2022 Sep 7]; 13(43): 1003-17. Available from: <https://doi.org/10.14295/idonline.v13i43.1574>.
31. Mohanasundari C, Natarajan D, Srinivasan K, Umamaheswari S, Ramachandran A. Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L.–a common exotic medicinal plant. *Afr J Biotechnol [Internet]*. 2007 [cited 2022 Sep 9]; 6 (23): 2650-3. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/58170>.
32. Fausto MC, Nonato IA, Fausto GC, Pinto R, Valente FL, Carvalho LM et al. Anthelmintic potential and in vivo acute toxicity study of *Piptadenia gonoachanta* leaf aqueous extract. *J App Pharm Sci [Internet]*. 2017 [cited 2022 Sep 7]; 7(10): 111-117. Available from: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.71016>

5.2. Produto técnico

Uso de plantas medicinais na resistência bacteriana



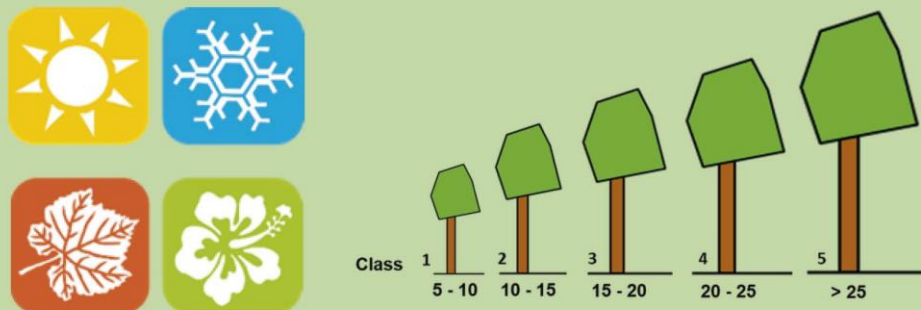
Apresentação

O uso indiscriminado de antimicrobianos tem proporcionado uma pressão seletiva de microrganismos frente aos fármacos. Portanto, esta cartilha tem como objetivo ressaltar a importância dos produtos naturais como uma alternativa para inovações farmacológicas antimicrobianas, bem como o clima pode influenciar na eficácia destes produtos.

Embora o uso de plantas medicinais seja uma prática antiga, existe uma infinidade de plantas que não foram totalmente exploradas quanto ao seu potencial para produção de medicamentos, como por exemplo, a espécie *Piptadenia gonoacantha*, uma árvore largamente distribuída por todo o território brasileiro, e que será descrita nesta cartilha.

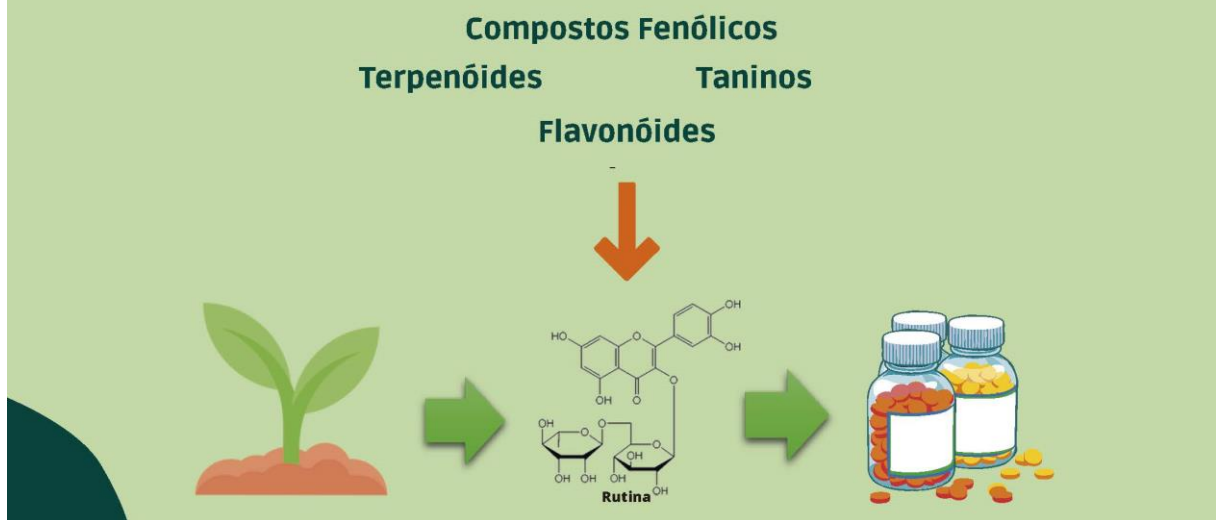
Os metabólitos biologicamente ativos, presentes nos vegetais, podem sofrer alterações na sua constituição, a depender do ambiente e ciclo vegetativo. A estação do ano e os estádios fenológicos de crescimento (*dap* - diâmetro à altura do peito) são fatores que influenciam na constituição fitoquímica de produtos naturais, levando a alterações na resposta terapêutica dos produtos finais.

Portanto, o desenvolvimento e a padronização destes produtos são de suma importância para sua eficácia clínica.



Compostos fitoquímicos com atividade biológica isolados de plantas e utilizados pela população por meio de extratos são fontes promissoras para a prospecção de novos antimicrobianos. Essas substâncias também podem atuar sinergicamente com outras drogas, melhorando potencialmente a ação antibiótica.

Dentre os compostos bioativos de origem vegetal, comumente utilizado com efeito antimicrobiano, estão:



A espécie *Piptadenia gonoacantha*, mais conhecida como "Páu-jacaré", tem revelado uma ótima fonte de compostos antimicrobianos.

Estudos sobre a melhor estação climática para colheita e se o diâmetro a altura da peito (dap) influenciam na sua atividade antibacteriana são importante melhor utilização da espécie e aprimorar a qualidade dos produtos naturais.



A colheita sendo realizada em árvores de menor altura diminui a área de plantio e ajuda no reflorestamento da espécie. Fatores importantes que favorecem a utilização da *Piptadenia gonoacantha* como precursor de novos fármacos.

Influência do clima e tamanho da planta na atividade antibacteriana



INVERNO



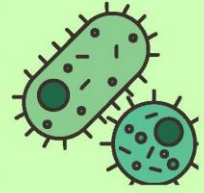
Vantagens de antimicrobianos a base de plantas

- Podem ser usadas em combinação com antibióticos convencionais.
- Maior segurança em termos de efeito colateral.
- Não há relatos de resistência bacteriana.
- Bioativos disponíveis mais facilmente se comparado a moléculas sintéticas.
- Extensa variedade de moléculas para tratamento de patologias.



Com isso...

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento é desproporcional ao avanço acelerado da resistência bacteriana. Ou seja, bactérias resistente surgem bem mais rápido do que um medicamento para combatê-la.



As plantas medicinais são uma alternativa viável economicamente e com grande potencial terapêutico. Porém, como os componentes ativos das plantas são variáveis, compreender a melhor época de crescimento do vegetal e a época adequada de colheita garantem uma maior segurança de sua utilização para fabricação de formulações farmacêuticas.



Vale ressaltar que o controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível no meio comercial, pois muitas espécies vegetais são vendidas sem quaisquer garantias de qualidade, favorecendo, desde a venda de espécies falsificadas, até o armazenamento inadequado durante a sua comercialização.

Refência Bibliográfica

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/medicamentos/fitoterpicos>. Acesso em: 03 novembro 2022.

Carvalho, CA; Silva MB; Oliveira, TG; Lima, JM; Rosa, MB. Estudo espectrométrico de diferentes estágios fenológicos da *Brassica oleracea* var. capitata. *Revista Brasileira de Farmacognosia* [online]. 2008, v. 18, n. 2 [Acessado 11 Novembro 2022], pp. 249-257. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200020>>. Epub 01 Ago 2008. ISSN 1981-528X. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200020>.

EDSON-CHAVES, Bruno; SANTOS-SILVA, Leyde Nayane Nunes dos; CORTEZ, Priscila Andressa. Atuação e potencialidades da Anatomia Vegetal. In: MONTEIRO, Scarlet Santos et al. (Org.). *Botânica no Inverno 2021*. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2021. p. 153-165.

Santos SC, Ferreira FS, Rossi-Alva JC, Fernandez LG. In vitro antimicrobial activity of the extract of *Abaremacochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. *Braz J. Pharmacogn* [Internet]. 2007 [cited 2022 Aug 9]; 17(2): 215-9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200014>.

SILVA, Líllian Oliveira Pereira; NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. *Rev. bras. anal. clin*, p. 21-27, 2021.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 21 jul. 2022.

UFV

Universidade Federal de Viçosa

Produto técnico da pesquisa de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade Federal de Viçosa - MG

Departamento de Medicina e Enfermagem



Material produzido pela mestranda:

Gisele Carvalho Mendes

Orientador:

Camilo Amaro de Carvalho

REFERÊNCIAS

- AKERELE, O. Resumo das Diretrizes da OMS para a Avaliação de Fitoterápicos. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-19, 1993.
- ANDALORO, J. T. *et al.* Cabbage Growth Stages. **New York's Food and Life Sciences Bulletin**, n. 101, p. 362-369, 1983. Disponível em: <https://ecommons.cornell.edu/bitstream/handle/1813/5112/FLS-101.pdf;sequence=1> Acesso em: 22/02/2023.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos. Farmacopeia Brasileira. Primeiro Suplemento**. 1ª edição, 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/formulario-fitoterapico/arquivos/8086json-file-1> Acesso em: 03 dez. 2019.
- ARANCIBIA, J. M. Estrategias para el uso de antibióticos en pacientes críticos. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 30, n. 2, p. 151–159, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2019.03.001>
- ARIAS, T. D. **Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso**. Washington: Organización Panamericana de La Salud/Organización Mundial de La Salud, 1999. ISBN: 92 75 32305 4. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/751?locale-attribute=es> Acesso em: 22/02/2023.
- BASTOS, M. L. A. *et al.* Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 1–6, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-0711-8-16>
- BERTINI, L. M. *et al.* Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, jan. 2005. Disponível em: <https://revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=285> Acesso em: 26/02/2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2. ed. – Brasília, DF. 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf Acesso em: 21/02/2023.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, DF. 2012. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf Acesso em: 26/02/2023.
- BROWNE, K. *et al.* A New Era of Antibiotics: The Clinical Potential of Antimicrobial Peptides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 7047–7070, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21197047>

CARDOSO, F. L. *et al.* Análise sazonal do potencial antimicrobiano e teores de flavonoides e quinonas de extratos foliares de *Aloe arborescens* Mill., Xanthorrhoeaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 35–40, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100008>

CARVALHO, C. A. *et al.* Cipó-cravo (*tynnanthus fasciculatus* miers – bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo artemia salina. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n. 1, 2009. DOI: <https://doi.org/10.5216/ref.v6i1.5861>

CARVALHO, C. A. *et al.* Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato das folhas de *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) Macbr. em modelos experimentais animais. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 775–781, 2014. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/index.php/cienciaenatura/article/viewFile/13555/pdf> Acesso em: 27/02/2023.

CARVALHO, C. A. **Caracterização Botânica, Fitoquímica e avaliação da Atividade biológica de extratos de *Piptadenia gonoacantha* (mart.) J.f. macbr (fabaceae)**. 2012. 71f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Estrutural). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/283/1/texto%20completo.pdf> Acesso em: 26/02/2023.

CARVALHO, M. G. de *et al.* Chemical constituents of *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F. Macbr (pau jacaré). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 561–567, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652010000300003>

CARVALHO, P. E. R. Pau-Jacaré – *Piptadenia gonoacantha*. **Circular Técnica 91**, 2004. ISSN 1517-5278. Disponível em: <http://www.bibliotecaflorestal.ufv.br/handle/123456789/4543> Acesso em: 22/02/2023.

CHAVES, B. E.; SILVA, L. N. N. S.; CORTEZ, P. A. Atuação e potencialidades da Anatomia Vegetal. In: MONTEIRO, S. S. *et al.* **Botânica no Inverno 2021**. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2021. p. 153-165.

CHEESMAN, M. *et al.* Developing new antimicrobial therapies: Are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? **Pharmacognosy Reviews**, v. 11, n. 22, p. 57–72, 2017. DOI: https://doi.org/10.4103/phrev.phrev_21_17

CHERNOV, V. M. et al. Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 5, p. 455–468, 19 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1588880>

CLARK, R. A. F. **The molecular and cellular biology of wound repair**. Springer Science & Business Media, 2013. 612p. ISBN: 978-1-4899-0185-9.

COSTA, F. V. **Influência de fatores ambientais na produção de metabólitos secundários de *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less. (Asteraceae)**. 2017. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), Criciúma, 2017. Disponível em: <http://repositorio.unesc.net/handle/1/5147> Acesso em: 25/02/2023.

DARSKI, C.; KUHL, C.P.; TERRACIANO, P.B.; NIENOV, O.H. Desfechos quantitativos: amostras independentes. *In*: Capp, E., Nienov, O.H. **Bioestatística quantitativa aplicada**. Porto Alegre: UFRGS; 2020. p. 125-156. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/213116/001117616.pdf> Acesso em: 25/02/2023.

DHEMAN, N. *et al.* An Analysis of Antibacterial Drug Development Trends in the United States, 1980–2019. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 11, p. 4444–4450, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa859>

FABRI, R. L. *et al.* Identification of Antioxidant and Antimicrobial Compounds of *Lippia* Species by Bioautography. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7–8, p. 840–846, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0141>

FARIA, C. A. **Efeito da sazonalidade e classe diamétrica sobre o teor de rutina em Piptadenia gonoacantha (Mart.) JF Macbr. (FABACEAE)**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciências da Saúde). 2021. 48p. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2021. Disponível em: <https://locus.ufv.br//handle/123456789/28640> Acesso em: 22/02/2023.

FAUSTO, M. C. *et al.* Anthelmintic potential and in vivo acute toxicity study of Piptadenia gonoacantha leaf aqueous extract. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 10, p. 111–117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.71016>

FERREIRA, L. **Periodicidade do crescimento e formação da madeira de algumas espécies arbóreas de florestas estacionais semidecíduas da região sudeste do estado de São Paulo**. 2002. 122p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

FRANCO, A. J. **JACBIO®: formulações dermocosméticas e/ou farmacêuticas à base de Piptadenia gonoacantha com atividade antimicrobiana e uso**. 2018. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Saúde). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/21622/1/texto%20completo.pdf> Acesso em: 25/02/2023.

FRANCO, L. L. **Doenças tratadas com plantas medicinais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Vozes, 2003.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GONÇALVES, R. V. *et al.* Comparative study of the effects of laser photobiomodulation and extract of Brassica oleracea on skin wounds in wistar rats: A histomorphometric study. **Pathology - Research and Practice**, v. 209, n. 10, p. 648–653, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2013.07.006>

GONÇALVES, L. A. *et al.* Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003. Disponível em:

https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMedicinais/artigo2_v6_n1.pdf Acesso em: 26/02/2023.

GUSMÃO, A. O. de M.; SILVA, A. R. da; MEDEIROS, M. O. A biotecnologia e os avanços da sociedade. **Biodiversidade**, v. 16, n. 1, p. 135–154, 2017. Disponível em: <https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/biodiversidade/article/view/4979> Acesso em: 25 fev. 2023.

HALUCH, S. M. *et al.* Prospecção de novos antimicrobianos e bactericidas frente a microrganismos de interesse de saúde pública / Prospecting new antimicrobials and bactericides to combat microorganisms of public health interest. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 4, p. 3630–3652, 2020. DOI: <https://doi.org/10.34188/bjaerv3n4-069>

HAMIDI, M. R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T. K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Maced pharm bull**, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2014. Disponível em: http://bulletin.mfd.org.mk/volumes/Volume%2060/60_002.pdf Acesso em: 25/02/2023.

JANSEN, K. U.; ANDERSON, A. S. The role of vaccines in fighting antimicrobial resistance (AMR). **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 14, n. 9, p. 2142–2149, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1476814>

LIMA, I. de O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011>

LIU, Y. *et al.* Drug repurposing for next-generation combination therapies against multidrug-resistant bacteria. **Theranostics**, v. 11, n. 10, p. 4910–4928, 2021. DOI: <https://doi.org/10.7150/thno.56205>

MARAN, R. S. *et al.* Programa para otimização do uso de antimicrobianos (PROA): experiência de um hospital de médio porte. **Journal of Infection Control**, v. 9, n. 1, p. 1-5, 2020. Disponível em: <https://jic-abih.com.br/index.php/jic/article/view/284/0> Acesso em: 25/02/2023.

MARIA, V. R. B. **Estudo da periodicidade do crescimento, fenologia e relação com a atividade cambial de espécies arbóreas tropicais de florestas estacionais semidecíduais**. Dissertação (Mestrado). 2002. 145p. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.11.2002.tde-21082002-141838>

MARMITT, D. J. *et al.* Plantas com potencial antibacteriano da relação nacional de plantas medicinais de interesse do sistema único de saúde: revisão sistemática. **Rev. Saúde Públ. Santa Cat.**, v. 8, n. 2, p. 135–152, 2015. Disponível em: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/11/1129299/plantas-com-potencial-antibacteriano-da-relacao-nacional-de-pl_gy9BcVq.pdf Acesso em: 25/02/2023.

MARTINS, M. C.; GARLET, T. M. B. Desenvolvendo e divulgando o conhecimento sobre plantas medicinais. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 438–448, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5902/2236117019990>

MENGUE, S. S.; MENTS, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais durante a gravidez. In: SANSEVERINO, M. T. V; SPRITZEL, D. T.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, p. 423-450, 2001.

MEYER, B. *et al.* Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

MOORE, B. D. *et al.* Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 733–750, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.12526>

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved Standard M7-A6**. 2nd ed., 2003.

NELSON, B.W. **Inventário florístico e fisionômico da Amazônia: tendência de amostragem nos herbários e potencial do sensoriamento remoto**. 1994. 216p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 1994. Disponível em: <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/38281> Acesso em: 25/02/2023.

OGIDI, C. O. *et al.* Food Value and Safety Status of Raw (Unfermented) and Fermented Higher Basidiomycetes, *Lenzites quercina* (L) P. Karsten. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 23, n. 3, p. 228–234, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.228>

OLIVEIRA, F. P. de *et al.* Atividade do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* isolados de material clínico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 510–516, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000400013>

OLIVEIRA, J. E. Z. *et al.* **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no centro de São João del-Rei, MG**. In: Anais do X Seminário Mineiro de Plantas Medicinais, Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, p. 113-114, 2004.

PAREKH, J.; CHANDA, S. V. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 31, p.53- 58, 2007. Disponível em: <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol31/iss1/9/> Acesso em: 25/02/2023.

PESSOA, D. R. **Estudo da toxicidade e atividade antitumoral do óleo essencial de *Croton polyandrus* Spreng. (EUPHORBIACEA) em modelo experimental de tumor ascítico de erlichea**. 2013. 108p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6760> Acesso em: 25/02/2023.

PONNUSAMY, Y. *et al.* Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 305–314, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.062>

PPGCS. Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde. **Informativo: Pesquisadores desenvolvem fármacos a base de Pau-jacaré e requerem patente para a UFV**. Disponível

em: <https://ppgcs.ufv.br/sem-categoria/1274/> Acesso em 06/06/2022.

RAMALHO, M. P. *et al.* Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: revisão de literatura. **Revista Expressão Católica Saúde**, v. 3, n. 2, p. 64-70, 2018. Disponível em: <http://publicacoesacademicas.unicatolicaquixada.edu.br/index.php/recsaude/article/view/2429> Acesso em: 25/02/2023.

RIBEIRO, C. G. P. **Validação de formulações JACBIO® a base de extratos de Piptadenia gonoacantha (Pau Jacaré) com atividade cicatrizante.** 2018. 33f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018. Disponível em: http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFV_b66eb73423b5e8e5337e277a98032bf3 Acesso em: 25/02/2023

SANTOS, S. C. *et al.* Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 215–219, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000200014>

SILVA, A. F. *et al.* Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 6, n. 2, p. 1-7 2003. Disponível em: https://www1.ibb.unesp.br/Home/Departamentos/Botanica/RBPM-RevistaBrasileiradePlantasMedicinais/artigo1_v6_n1.pdf Acesso em: 25/02/2023.

SILVA, Helena Taina Diniz. **Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em *Staphylococcus aureus*.** 2015. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Nutrição), Universidade Federal da Paraíba, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/7501> Acesso em: 26/02/2023.

SILVA, L. O. P.; NOGUEIRA, J. M. R. Uso indiscriminado de antibióticos durante a pandemia: o aumento da resistência bacteriana pós-COVID-19. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 53, n. 2, p. 185 – 186, 2021. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1352853> Acesso em: 26/02/2023.

SIQUI, A. C. *et al.* Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciên. Desenvol.**, v. 16, n. 9, p. 38-43, 2000.

SOUZA, L. F. T.; FERNANDES FILHO, E. I.; FARIA, M. M. Compartimentação geomorfológica e mapeamento digital de solos no município de Viçosa–MG. **Revista Geonorte**, v. 5, n. 16, p. 110-114, 2014. Disponível em: <https://www.periodicos.ufam.edu.br/index.php/revista-geonorte/article/view/1370> Acesso em: 27/02/2023.

TORRES, C. M. M. E. *et al.* Quantificação de biomassa e estocagem de carbono em uma floresta estacional semidecidual, no Parque Tecnológico de Viçosa, MG. **Revista Árvore**, v. 37, n. 4, p. 647-55, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000400008>

TRINDADE, L. C. T. *et al.* Avaliação do uso tópico do metronidazol no processo de cicatrização de feridas: um estudo experimental. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 37, n. 5, p. 358-363, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912010000500009>

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?.

Química Nova, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>

VERONA, J. D. **Classificação e monitoramento fenológico foliar da cobertura vegetal na região da floresta nacional do tapajós - pará, utilizando dados multitemporais do sensor thematic mapper (tm) do landsat**. 2002. 159p.

Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto). Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE), São José dos Campos, 2002. Disponível em: <http://mtc-m12.sid.inpe.br/col/sid.inpe.br/marciana/2003/02.19.13.36/doc/publicacao.pdf>

VERONA, J. D.; SHIMABUKURO, Y.E.; SANTOS, J. R. dos. **Potencialidade das imagens-fração multitemporais TM/Landsat na caracterização de variações fenológicas em área de floresta tropical na Amazônia**. In: Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia, Brasil, 16-21 abril 2005, INPE, p. 713-720. Disponível em: <http://marTE.sid.inpe.br/col/ltid.inpe.br/sbsr/2004/11.11.22.57/doc/713.pdf> Acesso em: 27/02/2023.

WALTER, H. **Vegetação e zonas climáticas: tratado de ecologia global**. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 1986. 325p.

WHO. World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> Acesso em: 02/09/2022.


WHO. World Health Organization. **Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections including tuberculosis**. Geneva: World Health Organization, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12> Acesso em: 28/02/2023.

WU, X. *et al.* The effects of Polygonum cuspidatum extract on wound healing in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 934–937, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.03.040>

ANEXOS

ANEXO A – Comprovante de submissão do artigo na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



**Revista da Sociedade Brasileira
de Medicina Tropical**
*Journal of the Brazilian Society
of Tropical Medicine*

Influência dos estádios fenológicos de crescimento e sazonalidade de *Piptadenia gonoacantha* na produção de novos agentes antibacterianos para a saúde

Journal:	<i>Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Major Article
Keyword:	

SCHOLARONE™
Manuscripts

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resumo gráfico das etapas realizadas no teste de atividade antibacteriana.

